

酶育牛黄对血脂异常小鼠高密度脂蛋白功能的改善作用

邵明珠, 宋国华, 刘化侠, 秦树存

(山东省高校动脉粥样硬化重点实验室 泰山医学院动脉粥样硬化研究所 泰山医学院护理学院, 山东省泰安市 271000)

[关键词] 酶育牛黄; 高密度脂蛋白功能; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨酶育牛黄(CBCG)对高脂食物诱导的血脂异常小鼠高密度脂蛋白(HDL)功能的影响。方法 7~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 41 只,随机分三组:对照组(溶媒组, $n=14$)、CBCG 高剂量组[2.25 g/(kg·d), $n=14$]、CBCG 中剂量组[0.75 g/(kg·d), $n=13$]。高脂(15.8%)高胆固醇(1.25%)饮食,自由饮水。连续灌胃 12 周后,禁食 12 h,麻醉,小鼠内眦静脉取血,通过超速离心法获得低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)。通过胆固醇逆向转运(RCT)功能实验检测 HDL 对巨噬细胞源性泡沫细胞的胆固醇溢出的影响;通过 HDL 对 Cu^{2+} 诱导的 LDL 氧化程度的保护作用,检测 HDL 的抗氧化功能;通过 MTT 比色法检测内皮细胞存活率,检测 HDL 抗内皮细胞凋亡功能;通过单核细胞黏附实验检测 HDL 抗炎功能。另外,40 只 7~8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为四组:对照组(溶媒组, $n=10$)、CBCG 低、中及高剂量组[0.25 g/(kg·d)、0.75 g/(kg·d)、2.25 g/(kg·d), $n=10$]。给予高脂(15.8%)高胆固醇(1.25%)饮食,自由饮水。连续灌胃 8 周末,禁食 12 h,麻醉,小鼠内眦静脉取血,取材。ELISA 检测血浆炎症因子白细胞介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平,分光光度计法检测血浆丙二醛(MDA)和对氧磷酶 1(PON-1)水平;ELISA 测定 CBCG 血浆活性成分胆红素和牛磺酸水平;酶法测定血浆总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)水平。结果 CBCG 可显著改善 C57BL/6J 小鼠血浆 HDL 功能,主要表现在促进巨噬细胞内 ^3H 标记胆固醇的溢出;抑制 Cu^{2+} 诱导的 LDL 氧化作用;抑制单核细胞黏附作用和改善内皮细胞保护作用。另外,血浆 IL-6 和 TNF- α 水平显著降低,血浆氧化生物指标 MDA 显著降低, PON-1 显著升高;CBCG 高剂量组血浆胆红素水平显著高于对照组,血浆牛磺酸水平呈升高趋势,但差异无统计学意义。CBCG 治疗组 TC 和非高密度脂蛋白胆固醇(non-HDL)水平变化无统计学意义, HDL 水平显著升高。结论 CBCG 能改善 C57BL/6J 小鼠 HDL 功能,包括促进胆固醇溢出、抗氧化、抗凋亡、抗黏附和内皮保护作用。这种对 HDL 功能的改善作用可能与 CBCG 的血浆抗氧化作用有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effects of Calculus Bovis Cultivated by Glucuronidase on Functionality of High Density Lipoprotein in Mice Fed with High Cholesterol Diet

SHAO Ming-Zhu, SONG Guo-Hua, LIU Hua-Xia, and QIN Shu-Cun

(Key Laboratory of Atherosclerosis in University of Shandong Province & Atherosclerosis Institute of Taishan Medical University & School of Health Care of Taishan Medical University, Taian, Shandong 271000, China)

[KEY WORDS] Calculus Bovis Cultivated by Glucuronidase; HDL Functionality; Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of calculus bovis cultivated by glucuronidase (CBCG) on high density lipoprotein (HDL) anti-atherosclerotic functions in mice fed with high fat high cholesterol diet. **Methods** Forty one male 7-8-week-old C57BL/6J mice fed with high fat diet (15.8% fat and 1.25% cholesterol) were randomly divided into three groups: control group ($n=14$), medium-dose (0.75 g/(kg·d), $n=13$) and high-dose (2.25 g/(kg·d), $n=14$) CBCG treated groups. After 12 weeks of treatment, blood was collected from the retroorbital sinus of the C57BL/6J mice without dietary exposure for 12 h. LDL and HDL₃ were separated by sequential ultracentrifugation. HDL functionality as-

[收稿日期] 2015-10-29

[修回日期] 2015-12-06

[基金项目] 山东省泰山学者专项基金项目(zd056 和 zd057)

[作者简介] 邵明珠, 硕士, 护师, 研究方向为肿瘤护理、动脉粥样硬化, E-mail 为 shaoxiaozhu100624@126.com。宋国华, 博士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 girl_sapphire@163.com, 为共同第一作者。通讯作者秦树存, 博士, 教授, 研究方向为动脉粥样硬化, E-mail 为 scqin@tsmc.edu.cn。通讯作者刘化侠, 硕士, 教授, 研究方向为肿瘤护理、动脉粥样硬化, E-mail 为 hxliu@tsmc.edu.cn。

say, Cu^{2+} -induced LDL oxidation assay, endothelial cell-monocyte adhesion assay and MTT assay were determined to analyse the functional properties of the HDL particle. Forty male 7-8-week-old apolipoprotein E knockout mice fed with high fat diet (15.8% fat and 1.25% cholesterol) were randomly divided into four groups: control group, low-dose (0.25 g/(kg · d)), medium-dose (0.75 g/(kg · d)), and high-dose CBCG (2.25 g/(kg · d)) treated groups. After 8 weeks of treatment, blood was collected from the retro-orbital sinus of apolipoprotein E knockout mice without dietary exposure for 12 h. Plasma concentrations of IL-6 and TNF- α were determined by ELISA. Plasma levels of malondialdehyde (MDA) and the activity of paraoxonase-1 (PON-1) were determined by spectrophotometric method. The bioactive compounds, namely bilirubin and taurine were determined by ELISA. Plasma concentrations of total cholesterol (TC) and HDLC were determined by enzymatic methods. Non-HDLC was calculated as TC minus HDLC.

Results The anti-atherosclerotic actions of CBCG were linked with improving the functional quality of HDL particle in C57BL/6J mice, including reverse cholesterol transport (RCT)-promoting, anti-oxidative (prevention of LDL oxidation), endothelial protective as well as anti-inflammatory (induce adhesion of monocyte to human umbilical vein endothelial cells) properties. At the end of eight weeks of intragastric administration of CBCG, ELISA revealed that the production of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 were significantly suppressed. Spectrophotometric measurement showed that plasma levels of MDA were significantly decreased and the activity of PON-1 was significantly improved. CBCG significantly increased the plasma level of bilirubin while the change of taurine level was not obvious. Plasma analysis by enzymatic method showed that CBCG remarkably increased plasma HDLC in mice fed with high fat high cholesterol diet.

Conclusions The results reveal that CBCG significantly improve the functional quality of HDL particle in C57BL/6J mice, including RCT-promoting, anti-oxidative, endothelial protective as well as anti-inflammatory properties. The improving function may be linked with the anti-oxidation of CBCG in plasma.

发病率高居不下的动脉粥样硬化性心脑血管病一直是人类疾病高致残率和高致死率的主要原因^[1-2]。如何有效防治仍然是医学领域的研究热点。除了调脂药外,越来越多的抗炎药物也被发现存在抗动脉粥样硬化作用^[3-4]。目前,仅有3个抗炎药,即甲氨蝶呤、darapladib(脂蛋白相关磷脂酶A2抑制剂)、canakinumab(人抗白细胞介素1 β 单克隆抗体),进入了动脉粥样硬化Ⅲ期临床试验^[5-6]。临床试验显示抗氧化剂的治疗结果亦不令人满意。例如, α -生育酚在冠心病的一级预防中发挥较好的效应,但对已经发生缺血的心脏病患者却没有正性作用。中药防治动脉粥样硬化是我国的特色与优势。中药从宏观着手,整体施治,对于动脉粥样硬化具有独特的优势。

酶育牛黄(calculus bovis cultivated by glucuronidase, CBCG)^[7-8]是课题组自行研制的一种体外培育牛黄。胆红素、胆酸、牛磺酸和无机元素等是CBCG的重要组成部分,其生产工艺稳定,胆红素含量,指纹图谱和胆酸类成分与天然牛黄类似^[9-10]。胆红素是体内一种天然的内源性抗氧化剂,早有研究发现,胆红素具有比维生素E更强的抗氧化活性,被认为是脂质过氧化的最佳抗氧化剂^[11-12]。流行病学研究^[13]发现血浆低胆红素水平是心血管疾病独立危险因素,并且不存在性别差异。牛黄降压制剂应用于临床已有20余年,机制主要为扩张血管,降低外周阻力,调整心肌顺应性,并通过降低血管紧张素、醛固酮、内皮质激素水平,起到降压作用。牛

黄降压丸不仅能稳定血压,而且能降低血浆内皮素(endothelin, ET)水平,升高一氧化氮(nitric oxide, NO)水平,从而保护和改善血管内皮功能^[12]。至今,研究已揭示了CBCG具有镇静、抗炎、抗肿瘤等广泛药理作用,可降低毛细血管通透性、稳定溶酶体膜、清除氧自由基和减少炎症介质等发挥抗炎和抗氧化作用^[10-13]。

血浆高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平与动脉粥样硬化性心脑血管疾病发病率呈负相关^[14-20],其主要机制在于高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)参与介导胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)过程,首要的就是促进荷脂细胞的胆固醇溢出^[15]。HDL是一种复杂的、异构的和多功能的脂蛋白颗粒,具有多效的保护作用,如抗炎、抗内皮细胞凋亡、抗氧化、抗血栓、内皮保护和胆固醇逆向转运特性^[16-20]。因此,本研究针对CBCG能否改善C57BL/6J小鼠HDL功能,探讨其促进胆固醇溢出、抗氧化和保护血管内皮细胞等功能的变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物

7~8周龄雄性C57BL/6J小鼠41只,随机分3组:对照组(溶媒组, $n=14$)、CBCG高剂量组[2.25 g/(kg · d), CBCG-H组, $n=14$]、CBCG中剂量组[0.75 g/(kg · d), CBCG-M组, $n=13$],连续灌胃

12 周后,禁食 12 h,麻醉,小鼠内眦静脉取血,通过超速离心法获得低密度脂蛋白(low density lipoprotein,LDL)、HDL。7~8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠 40 只,随机分 4 组,每组 10 只:对照组(溶媒组)、CBCG 低、中及高剂量组[0.25、0.75 及 2.25 g/(kg·d)],又分别称为 CBCG-L 组、CBCG-M 组、CBCG-H 组。各组给予 CBCG 淀粉混悬液或淀粉液,连续灌胃 8 周。高脂(15.8%)高胆固醇(1.25%)饮食,自由饮水。高脂高胆固醇饲料购自北京维通利华实验动物有限公司。

1.2 细胞系

人急性白血病单核细胞株(THP-1)购自中国医学科学院基础所细胞中心;人脐静脉内皮细胞株(HUVEC)购自南京凯基生物工程有限公司;巨噬细胞 RAW264.7 购自中国科学院上海生物化学与细胞生物研究所细胞库。

1.3 血浆炎症和氧化应激指标检测

白细胞介素 6(interleukin-6,IL-6)ELISA 试剂盒购自 R&D SYSTEMS,采用定量夹心法酶免疫测定技术;肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α) ELISA 试剂盒购自 BG 公司,采用竞争法酶免疫测定技术;分光光度计测定吸光度值,公式法计算对氧磷酶 1(paraoxonase-1,PON-1)活性;采用 TBA 法测定丙二醛(malondialdehyde,MDA)。

1.4 CBCG 有效成分检测

血浆牛磺酸、胆红素试剂盒购自 BG 公司,实验

方法同 TNF- α 测定方法。

1.5 血脂检测

采用酶法测定血浆总胆固醇(total cholesterol,TC),清除法测定 HDLC,non-HDLC 的含量为 TC 减去 HDLC。

1.6 HDL 功能检测

参照我们以前的实验方法^[15]:①胆固醇溢出实验:³H 标记 ox-LDL 的细胞实验,分别检测上清液和细胞裂解液放射活性(cell lysis activity,CPM),计算外排率(%)=(实验组培养液上清 CPM/实验组总 CPM-对照组培养液上清 CPM/对照组总 CPM);②HDL 抗氧化功能实验;③单核细胞黏附实验;④细胞凋亡实验:MTT 法检测内皮细胞存活实验。

1.7 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计学软件对所获得的数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,均数两两比较采用 LSD-t(方差齐)和 Dunnett-t(方差不齐)检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 CBCG 活性成分比较

经 8 周灌胃给药,CBCG 高剂量组血浆胆红素水平显著高于对照组,升高了 47.63% ($P < 0.01$);血浆牛磺酸水平呈上升趋势,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$;图 1)。

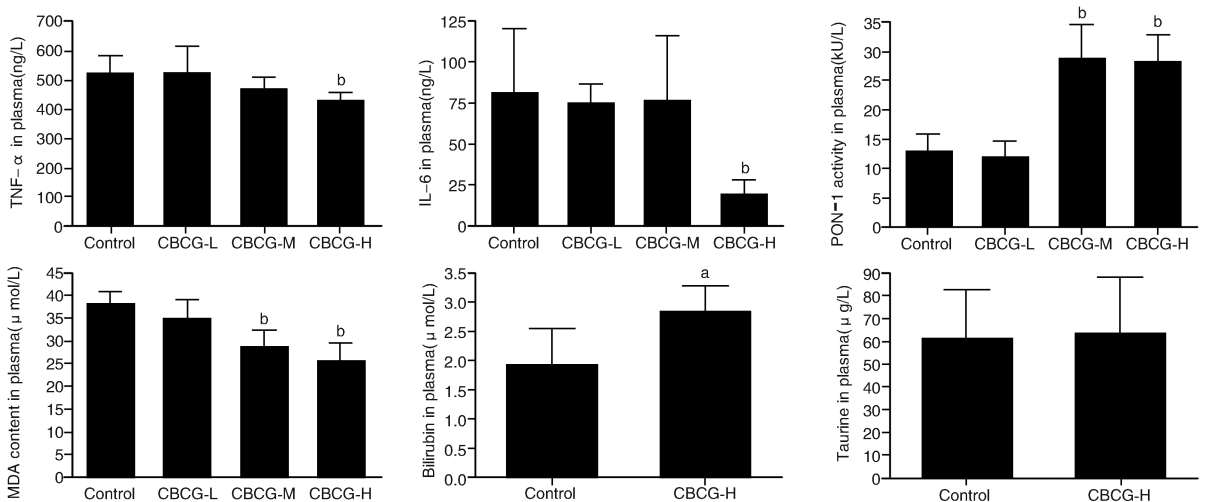


图 1. CBCG 对 ApoE^{-/-} 小鼠血浆炎症因子、氧化应激水平和活性成分的影响 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。
Figure 1. Effect of CBCG on plasma concentrations of TNF- α , IL-6, PON 1 activity, MDA, bilirubin and taurine in ApoE^{-/-} mice after 8 weeks treatment

2.2 血脂水平变化

灌胃给药后,与对照组相比,CBCG 中、高剂量

组血浆 HDLC 水平显著升高,分别升高了 21.39%、18.77% ($P < 0.05$),而血浆 TC、non-HDLC 水平无

显著变化(表1)。

表 1. CBCG 对 ApoE^{-/-} 小鼠血脂水平的影响($\bar{x} \pm s$, mg/dL)
Table 1. Effects of CBCG on plasma lipid levels in ApoE^{-/-} mice($\bar{x} \pm s$, mg/dL)

指标	对照组	CBCG 低剂量组	CBCG 中剂量组	CBCG 高剂量组
TC	521.00 ± 90.65	552.78 ± 179.38	587.70 ± 93.35	569.59 ± 101.25
HDLc	112.81 ± 21.15	120.93 ± 33.44	136.94 ± 18.61 ^a	133.98 ± 21.37 ^a
non-HDLc	408.19 ± 83.53	431.85 ± 150.56	450.76 ± 89.90	435.61 ± 91.42

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.3 小鼠体重变化及 CBCG 安全性评价

CBCG 灌胃给药后小鼠体重与对照组相比差异无统计学意义(表2);在连续灌胃过程中,小鼠行为表现、精神状态、外观毛色、分泌物、排泄物等一般

状况均无明显异常现象;肝脏、肾脏 HE 染色显示,细胞核完整,细胞轮廓清晰,未见急性和慢性中毒性损伤样病理改变,CBCG 给药组与对照组无明显差异(图2)。

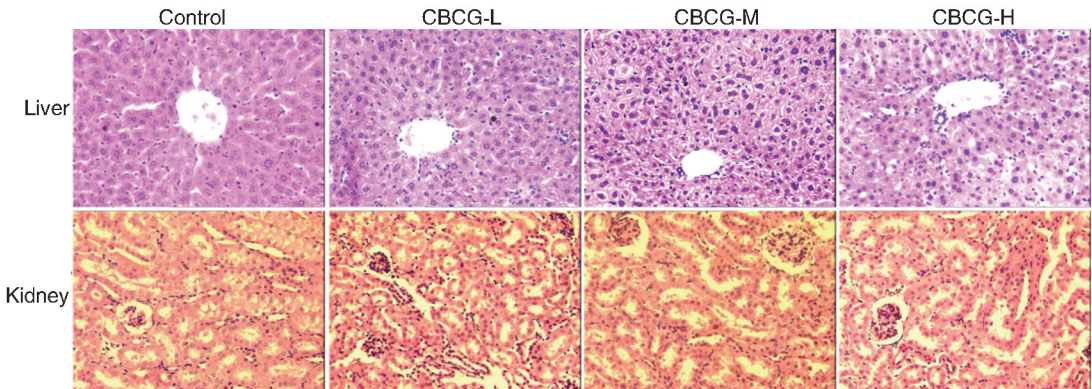


图 2. ApoE^{-/-} 小鼠肝脏、肾脏 HE 染色(20 ×)
Figure 2. HE staining of liver or kidney in ApoE^{-/-} mice(20 ×)

表 2. CBCG 灌胃前后 ApoE^{-/-} 小鼠体重变化($\bar{x} \pm s$, g)
Table 2. Effect of CBCG on the body weights of ApoE^{-/-} mice($\bar{x} \pm s$, g)

时间	对照组	CBCG 低剂量组	CBCG 中剂量组	CBCG 高剂量组
0 周	23.41 ± 1.72	23.68 ± 1.63	23.58 ± 1.79	23.58 ± 1.76
8 周	27.92 ± 2.07	28.01 ± 1.38	27.90 ± 2.16	27.73 ± 1.35

2.4 CBCG 对 HDL 功能的影响

与对照组相比,CBCG 高剂量组 HDL 显著增加胆固醇的溢出,增加了 173.99% ($P < 0.001$); CBCG 中、高剂量组 HDL 显著抑制 LDL 的氧化,降低 MDA 含量,分别降低了 28.07% 和 39.06% ($P < 0.001$);CBCG 中、高剂量组 HDL 显著抑制 ox-LDL 诱导的单核细胞向内皮细胞黏附过程,分别降低了 51.59% ($P < 0.01$) 和 64.19% ($P < 0.001$);CBCG 高剂量组 HDL 能显著抑制 ox-LDL 诱导的内皮细胞凋亡,抑制率达 49.33% ($P < 0.01$;图3)。

3 讨论

越来越多的学者倾向于动脉粥样硬化发生的

炎症反应学说^[1-3],随着炎症反应学说的不断完善和发展,抗炎治疗形成了抗动脉粥样硬化新方向。氧化应激介导脂质氧化,损伤内皮细胞,促进黏附分子表达,刺激血管平滑肌细胞增殖和迁移,调节基质金属蛋白酶的分泌等,多环节参与动脉粥样硬化的发展。所以,调节氧化应激是防治动脉粥样硬化另一有效靶点。他汀类是临床上应用最经典的血脂调节药物,大量的随机对照实验证明他汀类药物不仅通过降低脂质,而且通过抑制炎症,发挥抗心血管事件的作用^[3-5]。同样,一些抗炎药物被发现存在抗动脉粥样硬化的作用^[21-22]。目前,进入了动脉粥样硬化Ⅲ期临床试验抗炎药仅有三个(甲氨蝶呤、darapladib、canakinumab)。近期,darapladib 的第一个临床Ⅲ期研究并未发现明显的抗心血管疾病作用。临床抗氧化剂防治心血管疾病结果亦不令人满意。

CBCG 是一种体外培植牛黄,CBCG 生产工艺稳定,胆红素含量、指纹图谱和胆酸类成分与天然牛黄类似。实验研究已揭示了 CBCG 具有镇静、抗炎、

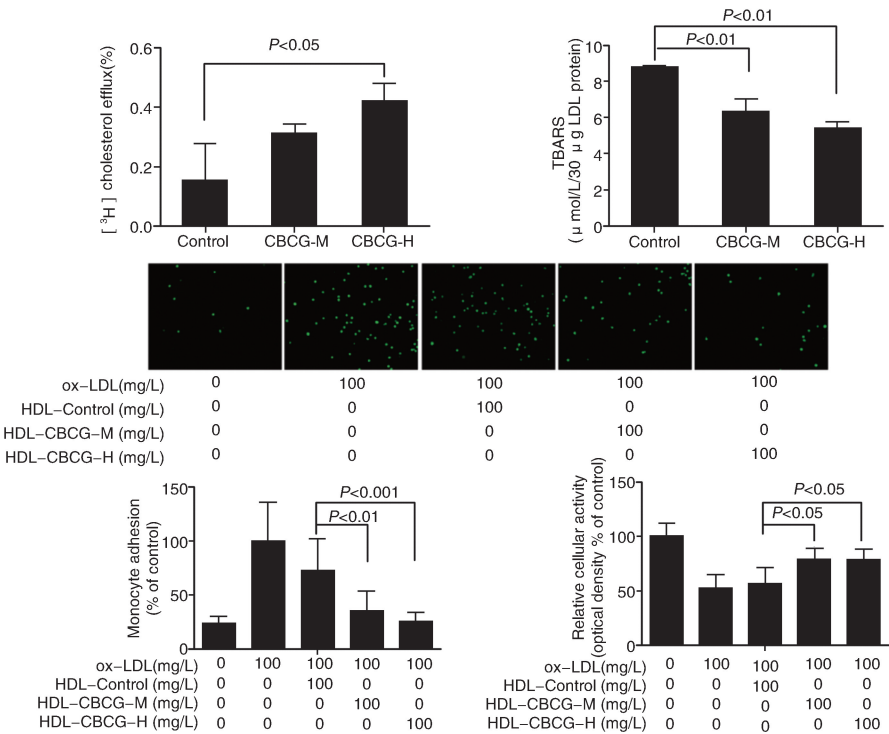


图 3. CBCG 对 HDL 功能的影响

Figure 3. Effect of CBCG on the functional quality of HDL particle in mice

抗肿瘤等广泛药理作用,可降低毛细血管通透性、稳定溶酶体膜、清除氧自由基和减少炎症介质等发挥抗炎和抗氧化作用^[11-14]。所以,我们认为 CBCG 可能会改善血浆脂蛋白的抗氧化和炎症能力。

HDL 是已知的冠状动脉心脏疾病负面风险因素^[15]。HDL 抗动脉粥样硬化活性主要是促 RCT 和对抗氧化性作用^[18-20]。本次实验发现,CBCG 给药可显著改善 HDL 的生物活性。CBCG 干预促进 HDL 的 RCT 功能,RCT 在动脉粥样硬化的发生和发展过程中有着重要作用。HDL 能够将外周组织中过多的胆固醇转运至肝脏并随胆汁排出,这一过程就是 RCT,RCT 的第一步就是转移荷脂细胞内的胆固醇至 HDL。本研究揭示 CBCG 干预可使 HDL 促进巨噬细胞源性泡沫细胞胆固醇溢出的功能增强,促进 HDL 的 RCT 功能。CBCG 干预促进 HDL 的抗氧化功能,HDL 的主要蛋白质 ApoA I、ApoA II 和 PON-1 具有显著的抗氧化特性,PON-1 以 HDL 为载体,与 ApoA I 紧密结合,通过抑制 LDL 氧化修饰,降低体内 ox-LDL 水平,从而发挥抗动脉粥样硬化作用。本研究揭示 CBCG 干预后 HDL 可对抗 CuSO_4 诱导的 LDL 氧化程度,CBCG 干预可明显改善 HDL 抗 LDL 氧化的功能。CBCG 干预促进 HDL 的抗炎功能,HDL 抗炎特性主要表现在抑制黏附分子的表达,减少血浆单核细胞向动脉管壁的聚集浸润。本

研究发现,CBCG 干预后 HDL 可显著降低 ox-LDL 诱导的单核细胞向血管内皮细胞黏附聚集,表明 CBCG 灌胃后 HDL 的抗炎功能得到改善。CBCG 干预促进 HDL 的抗细胞凋亡功能,内皮细胞的损伤构成动脉粥样硬化的始发环节,内皮损伤学说与其他学说相互补充揭示动脉粥样硬化的病理过程。本实验应用 ox-LDL 刺激血管内皮细胞,诱导细胞凋亡,观察 CBCG 干预后 HDL 抗凋亡活性的改变,发现 CBCG 干预后 HDL 能够显著抑制 ox-LDL 诱导的细胞凋亡。显然 CBCG 灌胃给药后可显著改善 C57BL/6J 小鼠 HDL 的功能,包括促进胆固醇溢出、抗氧化、抗凋亡、抗黏附和内皮保护作用。

已知 IL-6 在人体急性期炎症反应中处于中心地位,主要由单核巨噬细胞分泌,是新近发现的与动脉粥样硬化呈正相关的炎症因子期反应蛋白^[23-25],直接促进骨髓造血、增加血小板数目和活性,促进血栓形成。受损内皮细胞、平滑肌细胞、白细胞等均可分泌 IL-6 作用于血管壁损伤血管,促进动脉粥样硬化的形成与发展。TNF- α 主要由活化的巨噬细胞分泌,是一种多功能细胞因子,可直接损伤内皮细胞,引发内皮功能紊乱,促进动脉粥样硬化的发生和发展,又可抑制平滑肌细胞间质胶原基因的表达,降低斑块稳定性。TNF- α 、IL-6、NF- κB 等众多细胞因子形成网络系统,既可促进 IL-6 的基因

表达,IL-6 等又反过来增强组织细胞对 TNF- α 的敏感性,相互作用、共同促进动脉粥样硬化的发生与发展^[26-27]。本研究发现,CBCG 高剂量组小鼠的血浆 TNF- α 和 IL-6 水平显著降低,表明 CBCG 可能影响血浆炎症进展。有研究发现,胆红素体外实验微摩尔浓度即可显著抑制过氧化氢自由基的产生,当实验氧浓度降为 2% 时,胆红素抑制氧化的作用强于维生素 E,被认为是脂质过氧化的最佳抗氧化剂^[13-14]。本实验 CBCG 的主要组成成分为胆红素,前期实验发现,连续 4 周 CBCG 灌胃用药后,CBCG 显著提高血浆胆红素水平。因此,CBCG 连续灌胃 8 周后,CBCG 中、高剂量组小鼠血浆 MDA 含量显著下降,PON-1 活性显著增加,CBCG 高剂量组血浆胆红素含量显著升高,而血浆牛磺酸水平无显著变化,但呈上升趋势。这些结果表明 CBCG 可减轻脂质和脂蛋白氧化和过氧化水平,CBCG 改善 HDL 功能可能归因于血浆胆红素水平和抗氧化酶活性的升高以及脂质过氧化水平的下降。

总之,CBCG 可显著改善血脂异常小鼠的 HDL 功能。CBCG 灌胃给药使小鼠 HDL 功能得到了很大程度的改善:抗凋亡、抗氧化、抗单核细胞黏附等显著提高,并且加大了胆固醇的溢出。CBCG 改善 HDL 功能的作用可能得益于其显著下调血浆 IL-6、TNF- α 、MDA 含量和上调 PON-1 活性。本实验结果为 CBCG 作为治疗心脑血管疾病的新药物研发提供了脂蛋白功能改善的实验依据。

[参考文献]

- [1] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. *Nature*, 2002, 420: 868-874.
- [2] Williams HJ, Fisher EA, Greaves DR. Macrophage differentiation and function in atherosclerosis: opportunities for therapeutic intervention[J]. *Innate Immun*, 2012, 4: 498-508.
- [3] Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease[J]. *N Eng J Med*, 1999, 340 (2): 115-126.
- [4] Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis[J]. *Science*, 1991, 251: 788-791.
- [5] Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C. Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease[J]. *Circulation*, 2001, 104: 1 336-342.
- [6] Stocker R. Role of oxidative modifications in atherosclerosis[J]. *Physiol Rev*, 2003, 84: 1 381-478.
- [7] 周广礼,高允生,赵晓民,等.一种化学法工业化生产牛黄的方法[P].中国专利:101461826,2011-06-08.
- [8] 李珂,王唯红,齐永秀.6种胆酸类成分的 HPLC-ELSD 测定法及在两种牛黄中的含量比较[J].*中国药理学杂志*,2010,45 (8): 626-629.
- [9] 李珂,齐永秀,于秀玲.酶促牛黄与天然牛黄 HPLC 指纹图谱比较研究[J].*中成药*,2011,33 (1): 1-5.
- [10] 王芬,李秉超,叶凤阁,等.培植牛黄清除·OH 自由基作用的研究[J].*辽宁中医杂志*,1999,26 (9): 426-427.
- [11] 谭德讲,王齐放.牛黄抗氧化作用的实验研究[J].*中药药理与临床*,1992,8 (3): 20-22.
- [12] 于首元.牛黄降压丸的降压疗效及其对交感神经活性的影响[J].*中国中药杂志*,2007,32 (2): 172-175.
- [13] Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance[J]. *Science*, 1987, 235: 1 043-046.
- [14] Horsfall LJ, Nazareth I, Petersen I. Cardiovascular events as a function of serum bilirubin levels in a large, statin-treated cohort[J]. *Circulation*, 2012, 126 (22): 2 556-564.
- [15] Song G, Li M, Sang H, et al. Hydrogen-rich water decreases serum low-density lipoprotein cholesterol levels and improves high-density lipoprotein function in patients with potential metabolic syndrome[J]. *J Lipid Res*, 2013, 54 (7): 1 884-893.
- [16] Zernecke A, Weber C. Improving the treatment of atherosclerosis by linking anti-inflammatory and lipid modulating strategies[J]. *Heart*, 2012, 98 (21): 1 600-606.
- [17] Van Lenten BJ, Navab M, Shih D, et al. The role of high-density lipoproteins in oxidation and inflammation[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2001, 11: 155-161.
- [18] Tran-Dinh A, Diallo D, Delbosc S, et al. HDL and endothelial protection[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 169: 493-511.
- [19] Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, et al. Antiinflammatory properties of HDL[J]. *Circ Res*, 2004, 95: 764-772.
- [20] Prosser HC, Ng MK, Bursill CA. The role of cholesterol efflux in mechanisms of endothelial protection by HDL[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23: 182-189.
- [21] Tousoulis D, Psarros C, Demosthenous M. Innate and adaptive inflammation as a therapeutic target in vascular disease: The emerging role of statins[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63 (23): 2 491-502.
- [22] van Diepen JA, Berbée JF. Interactions between inflammation and lipid metabolism: Relevance for efficacy of anti-inflammatory drugs in the treatment of atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228 (2): 306-315.
- [23] Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease[J]. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78 (6): 539-552.
- [24] Thomas PS. Tumour necrosis factor- α : the role of this multifunctional cytokine in asthma[J]. *Immunol Cell Biol*, 2001, 79: 132-140.
- [25] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2002, 105: 1 135-143.
- [26] Tabas I, Glass CK. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities[J]. *Science*, 2013, 339 (6116): 166-172.
- [27] Boyle JJ. Macrophage activation in atherosclerosis: pathogenesis and pharmacology of plaque rupture[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005, 3: 63-68.