

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-02-0140-05

大蒜素对高脂饮食 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化形成的影响

王喜欢, 张金华, 胡亚南, 张洪

(南阳市第二人民医院心血管内科, 河南省南阳市 473000)

[关键词] 大蒜素; 动脉粥样硬化; 泡沫细胞; 巨噬细胞; 清道夫受体

[摘要] 目的 观察大蒜素对高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-}小鼠巨噬细胞泡沫化及动脉粥样硬化形成的影响, 并从清道夫受体调控的角度探讨其相关的作用机制。方法 6周雄性 ApoE^{-/-}小鼠随机分为4组: 正常饮食组、高脂饮食组、高脂饮食+低剂量大蒜素组、高脂饮食+高剂量大蒜素组。采用血脂检测试剂盒测定小鼠血脂水平; 使用油红O染色法观察小鼠主动脉根部斑块形成面积和腹腔巨噬细胞泡沫化情况; Western blot法检测腹腔巨噬细胞中清道夫受体 SR-A 和 CD36 表达以及 JNK 和 p38 激酶磷酸化水平。结果 大蒜素可呈剂量依赖性降低高脂饮食小鼠总胆固醇、甘油三酯及低密度脂蛋白胆固醇的水平 ($P<0.05$), 并显著减少主动脉根部斑块面积以及腹腔巨噬细胞泡沫化的形成 ($P<0.05$)。Western blot 结果显示大蒜素不仅抑制高脂饮食所诱导的腹腔巨噬细胞中 SR-A 和 CD36 表达的增加 ($P<0.05$), 还能够显著减少 JNK 和 p38 激酶磷酸化水平。结论 大蒜素减少 SR-A 和 CD36 表达, 并抑制 JNK 和 p38 激酶激活, 从而发挥抗泡沫化和动脉粥样硬化的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects and mechanisms of allicin on atherosclerosis in high-fat diet fed mice

WANG Xi-Huan, ZHANG Jin-Hua, HU Ya-Nan, ZHANG Hong

(Department of Cardiology, Nanyang Second General Hospital, Nanyang, Henan 473000, China)

[KEY WORDS] Allicin; Atherosclerosis; Foam cell; Macrophages; Scavenger receptor

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Allicin on foam cell formation and atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice fed with high-fat diet, and to further explore the possible molecular mechanisms. **Methods** 6-week ApoE^{-/-} mice were randomly divided into four groups: normal diet, high-fat diet, high-fat diet with low dose of Allicin, high-fat diet with high dose of Allicin. Total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDLC) and high density lipoprotein cholesterol (HDL) were examined by a commercially available kit. Moreover, atherosclerotic plaque and foam cell formation were analyzed by oil red O, respectively. Further, the expression of SR-A and CD36 and the phosphorylation of JNK and p38 were determined by western blot. **Results** The level of TC, TG and LDLC in high-fat diet mice were dose-dependently decreased by Allicin ($P<0.05$). In addition, oil red O staining revealed that Allicin significantly inhibited the increase of atherosclerotic plaque and foam cell formation in high-fat diet mice ($P<0.05$). Furthermore, administration of Allicin markedly ameliorated high-fat diet induced increase of SR-A and CD36 expression and JNK and p38 phosphorylation in peritoneal macrophages ($P<0.05$). **Conclusion** Our findings demonstrate that Allicin ameliorates foam cell formation and atherosclerosis through inhibition of SR-A and CD36 expression and JNK and p38 phosphorylation.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是众多心脑血管疾病共同的病理基础, 由其所导致的心脑血管疾病如心肌梗死、脑中风已成为严重危害人类健康的主要疾病之一^[1]。大量临床研究及动物实验显示, 脂质代谢异常与动脉粥样硬化的发生发展密切相关, 如血浆中总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘

油三酯 (triglyceride, TG) 增高所导致的脂质沉积是动脉粥样硬化的重要始动环节^[2]。此外, 在动脉粥样硬化的病理过程中, 内膜下的巨噬细胞在清道夫受体 (如 SR-A 和 CD36) 的介导下, 大量吞噬氧化性脂质形成泡沫细胞, 过量脂质堆积促进细胞发生凋亡和坏死从而释放出脂质导致粥样硬化斑块的形

[收稿日期] 2016-08-20

[修回日期] 2016-09-27

[作者简介] 王喜欢, 硕士, 主治医师, 研究方向为动脉硬化疾病的基础与临床, E-mail 为 wangxihuanmed@126.com。

成^[3-4]。可见,研究巨噬泡沫细胞的形成对揭示动脉粥样硬化的发病机理具有重要意义。

在中国等亚洲国家,大蒜是一种药食两用的食品。大蒜素(allicin)则是从大蒜的鳞茎中提取的一种具有挥发性的硫化物^[5]。近年来,国内外关于对大蒜素的药用价值研究和应用越发重视。研究表明大蒜具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、提高免疫力等作用^[5-7]。而且,其防治心脑血管疾病的研究已逐渐引起广泛的关注,如文献[7-8]报道大蒜素具有抗动脉粥样硬化的作用,其机制可能与降血脂有关。然而,大蒜素在抗动脉粥样硬化过程中对脂质摄取的作用及其相关的分子机制不详,大蒜素是否通过抑制泡沫细胞形成发挥抗动脉粥样硬化作用尚不清楚。为此,本研究应用代谢关键基因敲除小鼠模型,观察大蒜素对动脉粥样硬化斑块形成的影响,并从泡沫细胞形成和清道夫受体表达的角度初步探讨大蒜素的抗动脉粥样硬化分子机制,为大蒜素防治动脉粥样硬化提供进一步有价值的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

大蒜素购自徐州莱恩药业有限公司;ApoE^{-/-}小鼠购自美国 Jackson 实验室;血脂检测试剂盒为南京建成生物科技有限公司产品;油红 O 染色液、蛋白酶抑制剂、细胞裂解液购于美国 Sigma 公司。SR-A 和 CD36 抗体购于美国 R&D 公司。p-JNK、JNK、p-p38、p38 和 GAPDH 购自美国 Santa Cruz 公司。PVDF 膜、脱脂奶粉、HRP 标记抗兔或抗羊二抗为碧云天公司产品。其余试剂为国产分析纯。

1.2 动物与分组

选用清洁级 6 周左右的雄性 ApoE^{-/-}基因敲除小鼠 40 只,将所有动物随机分为 4 组,每组 10 只,分别为正常饮食组(ND 组)、高脂饮食组(HFD 组)、高脂饮食+低剂量大蒜素组(HFD+LA 组)、高脂饮食+高剂量大蒜素组(HFD+HA 组)。正常饮食组给予普通饲料喂养,其余 3 组均给予高脂高胆固醇饲料(含 10%猪油和 1.25%胆固醇,购于广东省医学动物实验中心),喂养 12 周。于小鼠高脂饮食开始至结束,每日给予大蒜素灌胃,低、高剂量分别为每日 10 mg/kg 与 20 mg/kg。本研究动物实验得到南阳医学高等专科学校动物管理委员会依据南阳医学高等专科学校动物实验室动物准则批准实施。

1.3 血生化指标检测

喂养 12 周结束后,采集静脉血,静置 30 min,

4 000 rpm 常温离心 10 min 收集上清。总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL)水平均采用血脂检测试剂盒,具体步骤均参照说明书操作。

1.4 小鼠主动脉根部斑块病理学观察

血液标本采集结束后,剪开小鼠右心耳,快速用磷酸盐缓冲溶液从左心室逆行灌注至右心房流出澄清液体,分离小鼠心脏,放入 4%多聚甲醛中固定过夜,随后于蔗糖梯度溶液中脱水,制备 8 μ m 组织切片,待斑块病理学观察。采用 60%异丙醇润洗主动脉根部切片,然后用 0.3%油红 O 染色 5 min,60%异丙醇润洗 2 次,超纯水漂洗 3 次,在正立显微镜下观察斑块形成情况,并使用 Image J (1.41 版本,美国 NIH)统计分析斑块面积。

1.5 小鼠腹腔巨噬细胞的分离与培养

小鼠处死后,用注射器吸取 2 mL 磷酸盐缓冲溶液注入小鼠腹腔,轻揉小鼠腹部,吸出并收集腹腔内缓冲溶液,重复以上步骤 3 次。随后将收集的液体于室温 2 000 rpm 离心 10 min,弃上清,沉淀为腹腔巨噬细胞,细胞沉淀重悬后置于 RPMI 1640 培养液中培养。

1.6 油红 O 染色检测泡沫细胞脂滴形成情况

将分离后的巨噬细胞置于 4%多聚甲醛中固定 10 min,油红 O 染色前用 60%异丙醇润洗细胞 2 次,随后用 0.3%油红 O 染色 1 min,染色后用 60%异丙醇润洗 2 次,超纯水漂洗 3 次,最后放置于正立显微镜下观察细胞内脂滴形成情况。

1.7 Western blot 检测相关蛋白表达

使用含有 1%蛋白酶抑制剂的细胞裂解液裂解巨噬细胞,然后 12 000 rpm 离心 15 min,取上清收集蛋白并测定蛋白浓度,将上样总蛋白调至一致。蛋白经 10% SDS-PAGE 电泳分离后,以 200 mA 恒流电转至 PVDF 膜上,用含 5%脱脂奶粉的三羟甲基氨基甲烷盐酸盐吐温缓冲溶液(TBST)封闭 1 h,孵育相应一抗,4℃过夜,然后孵育相应二抗室温 1 h,化学发光法显色,成像扫描分析系统保存图像。

1.8 统计学分析

采用 SPSS15.0 软件进行分析,对体外腹腔细胞实验, n 代表每组老鼠的数量,每只老鼠进行 1 次实验。结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差分析采用单因素方差分析(ANOVA),两组间均数比较采用独立样本的 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大蒜素对血脂水平的影响

高脂喂养小鼠的 TC、TG、LDL 和 HDL 水平具明显高于 ND 组($P < 0.05$;表 1)。给予高低剂量

大蒜素喂养可显著降低 TC、TG、LDLC 水平 ($P<0.05$), 而且呈现剂量依赖性关系。但是在大蒜素喂养后, HDLC 水平在相同饮食的小鼠组间无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1. 4 组小鼠血脂水平变化情况 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 1. The lipid levels in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

分组	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)
ND 组	52.88±6.12	1.97±0.21	16.82±2.27	3.01±1.04
HFD 组	119.34±4.03 ^a	4.41±0.45 ^a	52.12±6.32 ^a	10.54±1.59
HFD+LA 组	107.24±3.34 ^{ab}	4.09±0.24 ^{ab}	44.11±2.73 ^{ab}	10.69±1.83
HFD+HA 组	101.68±4.83 ^{ab}	3.54±0.36 ^{ab}	40.54±2.81 ^{ab}	11.1±1.43

a 为 $P<0.05$, 与 ND 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 HFD 组比较。

2.2 大蒜素对主动脉根部斑块形成的影响

主动脉根部油红 O 染色结果显示, 小鼠高脂喂养 12 周后, 斑块面积明显高于 ND 组 ($P<0.05$), 说明高脂饮食后脂质蓄积明显增多。但是给予大蒜素喂养后, 与高脂饮食组比较, 主动脉根部斑块明

显减少 ($P<0.05$), 并随着大蒜素剂量的增加, 斑块形成面积越小 (图 1)。

2.3 大蒜素对泡沫细胞脂滴形成的影响

如图 2 所示, 与 ND 组比较, 高脂喂养小鼠腹腔巨噬细胞泡沫化显著增加 ($P<0.05$), 说明细胞内的脂滴沉积明显增多。通过灌胃给予了高低剂量的大蒜素后, 巨噬细胞泡沫化的形成明显受到抑制 ($P<0.05$)。

2.4 大蒜素对 SR-A 和 CD36 表达的影响

如图 3 所示, 与 ND 组比较, 高脂喂养小鼠腹腔巨噬细胞中的清道夫受体 SR-A 和 CD36 的蛋白表达均显著增加 ($P<0.05$)。而大蒜素则呈剂量依赖性抑制高脂饮食所引起的 SR-A 和 CD36 表达增加, 并且均具有统计学差异 ($P<0.05$)。

2.5 大蒜素对 JNK 和 P38 激酶的影响

如图 4 所示, 与 ND 组比较, 高脂喂养小鼠显著诱导 JNK 和 p38 磷酸化水平的增加 ($P<0.05$)。给予大蒜素处理后, 与 HFD 组比较, JNK 和 p38 磷酸化水平明显减小 ($P<0.05$)。

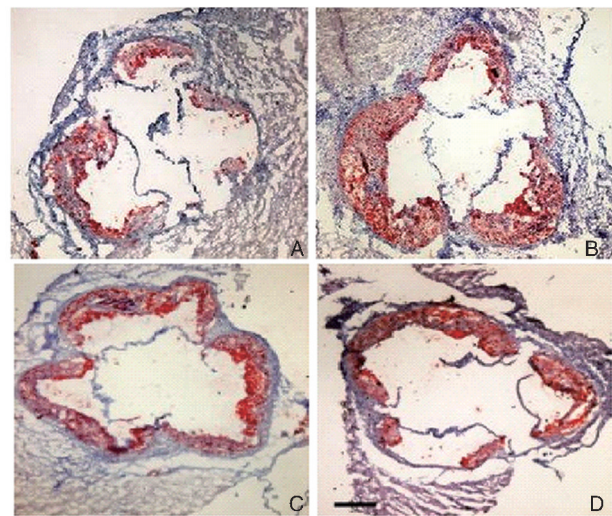


图 1. 大蒜素对小鼠主动脉根部斑块形成的影响 (100×, $n=10$) A 为 ND 组, B 为 HFD 组, C 为 HFD+LA 组, D 为 HFD+HA 组。a 为 $P<0.05$, 与 ND 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 HFD 组比较。
Figure 1. Effect of Allicin on atherosclerotic plaque

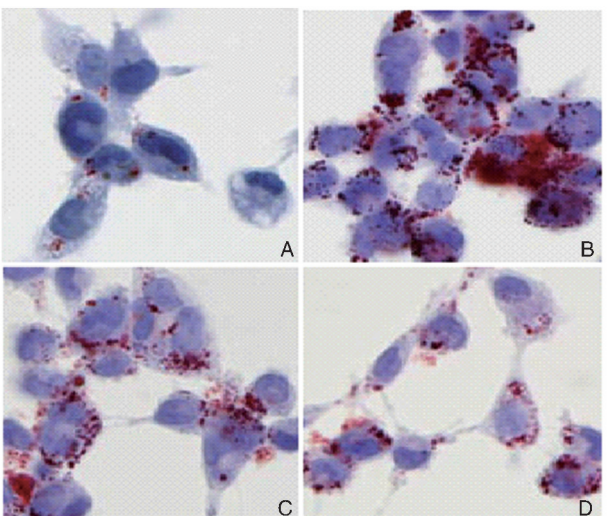


图 2. 大蒜素对小鼠腹腔巨噬细胞泡沫化的影响 (400×, $n=6$) A 为 ND 组, B 为 HFD 组, C 为 HFD+LA 组, D 为 HFD+HA 组。a 为 $P<0.05$, 与 ND 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 HFD 组比较。
Figure 2. Effect of Allicin on foam cell formation

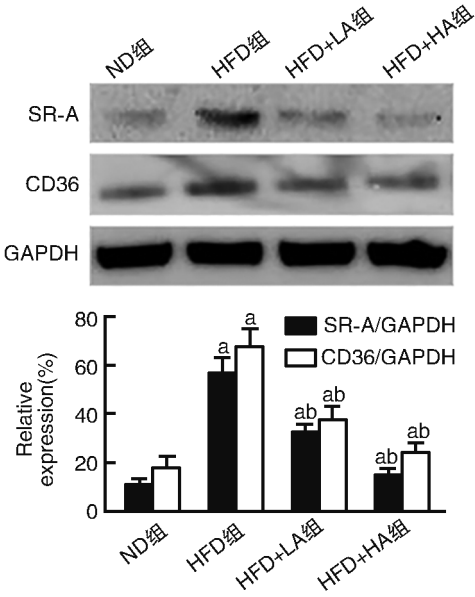


图 3. 大蒜素对 SR-A 和 CD36 表达的影响 (n=6) a 为 P<0.05, 与 ND 组比较; b 为 P<0.05, 与 HFD 组比较。
Figure 3. Effect of Allicin on SR-A and CD36 protein expression

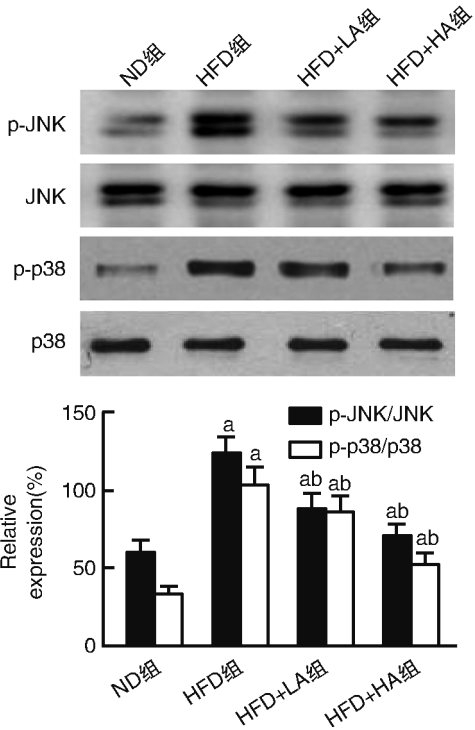


图 4. 大蒜素对 JNK 和 P38 激酶激活的影响 (n=6) a 为 P<0.05, 与 ND 组比较; b 为 P<0.05, 与 HFD 组比较。
Figure 4. Effect of Allicin on JNK and P38 activation

3 讨论

大蒜素,即二烯丙基硫代亚磺酸脂,是大蒜中有效成分。已有动物实验表明,大蒜素主要通过降

低血脂总胆固醇及肝脏 cAMP 水平从而发挥对血管的保护作用^[7-8]。同时,大蒜素降血脂的保护机制则是通过增加脂质分解和抑制胆固醇及脂肪酸合成而实现^[9]。临床数据亦表明使用大蒜素胶囊每日 80 mg 治疗 50 例高血脂症患者,6 周检测血脂相关指标,结果发现 TC、TG、LDLC 分别下降 12.1%、6.3%、17.3%^[10]。本研究与上述临床试验结果相似,即发现大蒜素对于因高脂饮食不当引起的血脂异常有一定的疗效,主要表现在血脂 TC、TG、LDLC 均有一定程度降低。本研究进一步结果表明大蒜素还能减少主动脉根部斑块的形成。

尽管本研究和其他研究结果均明确了大蒜素对脂质代谢紊乱和动脉粥样硬化的保护作用,然而其相关的作用机制却鲜有报道。巨噬细胞泡沫化与脂质沉积、摄取密切相关,是动脉粥样硬化发生的标志性事件^[1]。本研究发现大蒜素可以减缓高脂饮食过程中小鼠腹腔巨噬细胞泡沫化的进程,说明大蒜素能够通过减少细胞内胆固醇的堆积抑制巨噬细胞泡沫化从而发挥抗动脉粥样硬化的作用。

巨噬细胞表面既表达低密度脂蛋白受体 (LDLR) 又表达清道夫受体,LDLR 可介导细胞吞噬脂质,但是该过程受胞内脂质含量的反馈作用,从而阻止细胞摄取过量脂质,因此认为脂质不能直接使巨噬细胞发生泡沫化^[11]。更为重要的是,由清道夫受体如 SR-A 和 CD36 所介导的脂质摄取不受胞内脂质含量的反馈抑制,摄取的脂质反而会促进清道夫受体的表达进而加重泡沫化进程^[4]。由此可见,清道夫受体 SR-A 和 CD36 的表达直接影响到巨噬细胞内脂质的沉积情况,对巨噬细胞泡沫化具有重要的影响。在本研究中,给予大蒜素喂养可明显抑制高脂饮食所诱导清道夫 SR-A 和 CD36 蛋白表达的增加,说明大蒜素是通过调控清道夫受体的表达进而影响巨噬细胞泡沫化形成。MAPK 通路的 JNK 和 p38 激酶是调控清道夫受体以及动脉粥样硬化的重要信号通路^[12]。有研究发现在低密度脂蛋白 (ox-LDL) 处理条件下,JNK 和 p38 激酶的磷酸化发生变化^[13]。JNK 激酶被报道通过调控清道夫受体的表达与内吞从而调控动脉粥样硬化,JNK 基因敲除的巨噬细胞可抑制对脂质的摄取以及泡沫化的形成^[14]。本研究再一次证实在高脂刺激下,巨噬细胞中 JNK 和 p38 激酶磷酸化明显增加,当给予了大蒜素后,高脂饮食所引起 JNK 和 p38 的磷酸化受到了明显的抑制。以上结果说明大蒜素可能通过抑制 JNK 和 p38 的激活,从而参与了清道夫受体所介导的巨噬细胞泡沫化的进程。

综上所述,本研究发现大蒜素能有效的抑制高脂饮食诱导的 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的形成。结果表明,大蒜素不仅能一定程度抑制动脉粥样硬化过程中血脂的升高,也能够有效减少斑块面积以及腹腔巨噬细胞中脂质的沉积;此外,分子生物学实验显示,大蒜素还能显著减少清道夫受体 SR-A 和 CD36 的蛋白表达,其机制可能与大蒜素抑制 JNK 和 p38 激酶活化有关。

[参考文献]

- [1] 胡章乐, 王晓晨. 冠状动脉栓塞[J]. 临床与病理杂志, 2014, 34(2): 216-221.
- [2] Rosales C, Davidson WS, Gillard BK, et al. Speciated high-density lipoprotein biogenesis and functionality [J]. Curr Atheroscler Rep, 2016, 18(5): 25.
- [3] Shashkin P, Dragulev B, Ley K. Macrophage differentiation to foam cells [J]. Curr Pharm Design, 2005, 11(23): 3 061-072.
- [4] Twigg MW, Freestone K, Homer-Vanniasinkam S, et al. The LOX-1 scavenger receptor and its implications in the treatment of vascular disease[J]. Cardiol Res Pract, 2012, 2012: 632 408.
- [5] 王峰, 孟军, 邱忠仪. 不同剂量大蒜素与辛伐他汀降脂效果的比较[J]. 实用医技杂志, 2014, 21(6): 602-603.
- [6] Song B, Shu Y, Cui T, et al. Allicin inhibits human renal clear cell carcinoma progression via suppressing HIF pathway [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(11): 20 573-580.
- [7] 王淑丽, 田瑞振, 刘德山. 大蒜素防治心脑血管疾病机制的研究进展[J]. 医学通讯研究, 2005, 34(6): 69-71.
- [8] Lu Y, He Z, Shen, X, et al. Cholesterol-lowering effect of allicin on hypercholesterolemic ICR mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2012, 2012: 489 690.
- [9] 李睿坤, 李继锋, 周晓莹, 等. 大蒜素对动脉粥样硬化小鼠血脂代谢的影响[J]. 中华临床医师杂志, 2007, 1(1): 29-33.
- [10] Kojuri J, Vosoughi AR, Akrami M. Effects of anethum graveolens and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients [J]. Lipids Health Dis, 2007, 6: 5.
- [11] Liang SJ, Zeng DY, Mai XY, et al. Inhibition of orai1 store-operated calcium channel prevents foam cell formation and atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36: 618-628.
- [12] Nikolic D, Calderon L, Du L, Post SR. SR-A ligand and M-CSF dynamically regulate SR-A expression and function in primary macrophages via p38 MAPK activation [J]. BMC Immunol, 2011, 12: 37.
- [13] de Nigris F, Rienzo M, Sessa M, et al. Glycoxydation promotes vascular damage via MAPK-ERK/JNK pathways [J]. J Cell Physiol, 2012, 227(11): 3 639-647.
- [14] Sumara G, Belwal M, Ricci R. "Jnking" atherosclerosis [J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(21): 2 487-494.

(此文编辑 朱雯霞)