

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-09-0874-05

香青兰总黄酮对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化病变形成的影响

全翊宁¹, 王新春¹, 郭新红¹, 袁 勇¹, 曹文疆^{1,2}, 程 江^{1,2}

(1.石河子大学医学院第一附属医院, 新疆石河子市 832008; 2.石河子大学医学院, 新疆石河子市 832002)

[关键词] 香青兰总黄酮; 动脉粥样硬化; 细胞间黏附分子 1; 血管细胞黏附分子 1; 增殖细胞核抗原

[摘要] 目的 研究香青兰总黄酮对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化病变的作用及可能的机制。方法 载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠随机分为模型组、辛伐他汀组及香青兰总黄酮高、中、低剂量组,以 C57BL/6J 小鼠为正常对照组,给药第 12 周后处死,检测血清血脂水平,主动脉粥样硬化斑块面积/管腔面积比值,免疫组织化学染色观察主动脉壁细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 及增殖细胞核抗原的表达。结果 与模型组比较,各给药组可以显著降低血清甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$);苏木素伊红染色观察给药组动脉粥样硬化病变减轻,斑块面积/管腔面积比值减小($P<0.05$ 或 $P<0.01$);免疫组织化学染色显示给药组细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 及增殖细胞核抗原的表达下调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 香青兰总黄酮可能通过调节载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠血脂代谢及下调主动脉壁细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 及增殖细胞核抗原表达等的共同作用与影响,阻止载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化病变形成的发生、发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The effect of total flavones of dracocephalum moldavica on atherosclerosis lesions of apolipoprotein E gene deficient mice

QUAN Yi-Ning¹, WANG Xin-Chun¹, GUO Xin-Hong¹, YUAN Yong¹, CAO Wen-Jiang^{1,2}, CHENG Jiang^{1,2}

(1.The First Affiliated Hospital of Medical College, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China; 2.Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China)

[KEY WORDS] Total flavones of dracocephalum moldavica; Atherosclerosis; Intercellular cell adhesion molecule-1; Vascular cell adhesion molecule-1; Proliferating cell nuclear antigen

[ABSTRACT] Aim To investigate the effect and possible mechanism of total flavones of dracocephalum moldavica (TFDM) on atherosclerosis lesions in apolipoprotein E gene deficient (ApoE^{-/-}) mice. Methods ApoE^{-/-} mice were randomly divided into model group, simvastatin group and TFDM high, medium, low dose group, C57BL/6J mice were set as the normal control group. After treated for 12 weeks, the mice were sacrificed and plasma lipids were determined, the area of atherosclerotic plaques and the ratio of plaque area to aorta were measured by HE staining, the expressions of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in aortic atherosclerotic lesions were detected by immunohistochemistry analysis. Results Compared with the model group, the levels of triglyceride (TG) and low density lipoprotein cholesterol (LDLC) was decreased significantly in treatment group. The atherosclerotic lesions reduced and the ratio of plaque area to aorta decreased in TFDM groups. The expression of ICAM-1, VCAM-1 and PCNA were down-regulated by TFDM. Conclusion TFDM can inhibit atherosclerosis formation which involved in decreasing the level of plasma lipids and weakening the expression of ICAM-1, VCAM-1 and PCNA in the aorta wall.

香青兰为唇形科青兰属植物香青兰的干燥地上部分,系维吾尔族、蒙古族习用药材,在新疆资源

丰富^[1]。其主要的有效成分香青兰总黄酮(total flavones of dracocephalum moldavica, TFDM)具有降低

[收稿日期] 2016-11-11

[修回日期] 2017-03-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81460638;81660704;81360631)

[作者简介] 全翊宁,硕士研究生,研究方向为临床检验诊断学。通讯作者曹文疆,副主任技师,E-mail 为 cwjwxc@163.com。通讯作者程江,主任技师,研究方向为临床检验诊断学,E-mail 为 jyk6857@vip.163.com。

血脂、舒张血管、抗氧化、抑制血小板聚集等作用^[2-5]。课题组前期研究表明香青兰总黄酮能够抑制血管平滑肌细胞异常增殖和迁移的作用^[6-9]。因此,在此基础上,本研究利用载脂蛋白 E 基因缺陷 (apolipoprotein E gene deficient, ApoE^{-/-}) 小鼠建立动物模型,在体观察香青兰总黄酮对胸主动脉粥样硬化病变的影响,并从其对主动脉细胞间黏附分子 1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子 1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 和增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 表达的影响这一角度初步探讨香青兰总黄酮预防和治疗动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 Modular DPP-H7600 罗氏全自动生化分析仪; TGL-20B 高速台式离心机 (上海安亭科学仪器厂); OLYMPUS BX40 自动照相生物显微镜及图像分析系统。

1.1.2 药品与试剂 香青兰总黄酮 (新疆自治区药物研究所, 纯度为 57%, 批号为 20131109); 辛伐他汀片 (杭州默沙东制药有限公司, 批号 L019738); 胆固醇 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 108D102); ICAM-1 单克隆抗体 (批号 GR229795-1)、VCAM-1 单克隆抗体 (批号 GR185368-11)、PCNA 单克隆抗体 (批号 GR141502-9), 均购自美国 Abcam 公司; SABC 免疫组织化学试剂盒 (批号 K152317A), 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 动物 SPF 级 8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠 40 只, C57BL/6J 8 周龄雄性小鼠 8 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号为 SCXK 京 2012-0001。

1.2 实验分组

适应性喂养 2 周后, 将 40 只 8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为 5 组, 每组 8 只: 模型组 (给予相应生理盐水)、辛伐他汀组 (每天给予辛伐他汀 3.5 mg/kg)、TFDM 高、中、低剂量组 (每天分别给予 TFDM 84 mg/kg、42 mg/kg、21 mg/kg)。将 8 只 8 周龄 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组。

1.3 模型制备

正常对照组给予普通饲料喂养, 模型组给予高脂饲料 (0.75% 胆固醇、15% 猪油、84.25% 基础饲料) 喂养, 辛伐他汀组和 TFDM 组给予高脂饲料喂养, 并

每日以相应剂量的药物灌胃; 所有动物自由饮水, 连续饲喂 12 周。

1.4 血脂水平检测

小鼠处死前禁食 12 h 以上, 每组小鼠 20% 乌拉坦生理盐水溶液 0.2~0.3 mL 腹腔注射麻醉, 眼眶取血, 3000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 常规生物化学法测定血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 及高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 水平。

1.5 HE 染色观察主动脉病理变化

动物处死后完全分离心脏及主动脉, 将心脏和主动脉根部至髂动脉分叉段离断取出。取全部小鼠主动脉根部 1.0 cm 主动脉, 4% 多聚甲醛固定。组织标本脱水, 常规石蜡包埋, 均匀间断切片, 切片厚 5 μ m。HE 染色, 梯度酒精脱水, 中性树脂封片。于普通光学显微镜下观察主动脉组织病理改变。计算机病理图像分析软件测定 As 斑块大小、斑块面积占管腔面积的比值。

1.6 免疫组织化学法测定小鼠主动脉中 ICAM-1、VCAM-1 及 PCNA 的表达

采用链霉亲和素-生物素复合物法 (SABC 法) 测定主动脉壁 ICAM-1、VCAM-1 及 PCNA 的表达 (一抗稀释度 ICAM-1 和 PCNA 为 1:100, VCAM-1 为 1:250), 最后以 DAB 显色, 苏木素轻度复染, 无水乙醇脱水后于显微镜下观察。对于细胞浆表达的免疫组织化学图片, 用计算机图像扫描并半定量分析 ICAM-1 和 VCAM-1 表达的强弱 (以灰度值表示阳性率, 阳性率 = IOD/area); 对于细胞核表达的免疫组织化学图片, 通过对整个高倍镜视野下的图片进行细胞计数, 然后再计算 PCNA 阳性率 (阳性率 = 阳性细胞个数/视野中所有细胞个数)。

1.7 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 One-way ANOVA 单因素方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TFDM 对小鼠血脂水平的影响

与正常对照组相比, 模型组 TC、TG、LDLC 及 HDLC 水平均有明显增加 (P<0.01); 与模型组相比, 辛伐他汀组 TG、LDLC 水平显著降低 (P<0.01), HDLC 水平有所升高 (P<0.05), TFDM 高、中、低剂量组 TG 和 LDLC 水平呈剂量依赖性降低 (P<0.05)

或 $P<0.01$);TFDM 高、中、低剂量组和辛伐他汀组 TC 水平较模型组均无显著性差异。提示 TFDM 具有改善血脂紊乱的作用(表 1)。

表 1. TFDM 对 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$, mmol/L)
Table 1. Effects of TFDM on serum lipid levels in ApoE^{-/-} mice($\bar{x}\pm s$, $n=8$, mmol/L)

分 组	TC	TG	LDLC	HDLC
正常对照组	2.43±0.28 ^b	0.84±0.37 ^b	0.29±0.10 ^b	2.34±0.32 ^b
模型组	33.33±0.91	2.51±1.20	37.13±3.04	6.64±2.03
TFDM 低剂量组	32.45±0.87	1.06±0.86 ^a	31.69±2.31 ^a	7.56±1.07
TFDM 中剂量组	32.04±2.49	0.94±0.84 ^a	30.96±4.18 ^b	8.06±2.00
TFDM 高剂量组	30.13±3.98	0.64±0.15 ^b	27.99±5.78 ^b	8.09±0.73
辛伐他汀组	32.14±1.72	0.68±0.18 ^b	29.90±1.81 ^b	9.36±0.52 ^a

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与模型组比较。

2.2 TFDM 对小鼠主动脉病理形态学变化的影响

HE 染色显示,正常对照组小鼠主动脉血管壁层次清晰,内膜平滑完整,无 As 病灶;而模型组和各给药组小鼠主动脉均有不同程度的 As 病变产生。模型组主动脉部分斑块体积较大,融合成片,管壁弥漫性增厚,管腔明显狭窄,形成粥样斑块,纤维帽薄,脂质核心大,稳定性差,易破损。各给药组小鼠主动脉大多斑块体积较小,管腔狭窄程度较轻,病变较局限,血管内膜局部增厚,粥样斑块内纤维帽厚,脂质核心小,斑块趋于稳定。提示 TFDM 可能有抑制动脉粥样斑块形成,增强斑块稳定性的作用(图 1)。

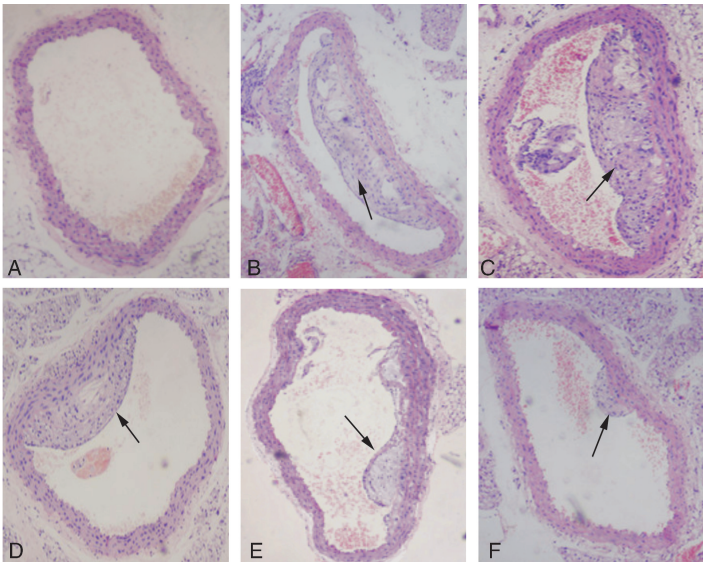


图 1. ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织病理学检查(HE 染色, 40×) A 为正常对照组, B 为模型组, C 为 TFDM 低剂量组, D 为 TFDM 中剂量组, E 为 TFDM 高剂量组, F 为辛伐他汀组。

Figure 1. Histopathologic examination of aorta in ApoE^{-/-} mice(HE staining, 40×)

2.3 各组小鼠主动脉斑块面积/管腔面积比值比较
5 组管腔面积差异无显著性($P>0.05$)。TFDM 高、中、低剂量组及辛伐他汀组斑块面积/管腔面

值均低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈现一定的剂量依赖性变化,各给药组间无显著性差异($P>0.05$),提示 TFDM 可明显减少 As 斑块面积(表 2)。

表 2. ApoE^{-/-}小鼠主动脉斑块面积及管腔面积比较($\bar{x}\pm s$)
Table 2. Comparison of aortic atherosclerotic plaque area and lumen area of ApoE^{-/-} mice in different groups($\bar{x}\pm s$)

分 组	n^{Δ}	管腔面积(μm^2)	斑块面积(μm^2)	斑块面积/管腔面积比值
模型组	7/8	867767±229091	545173±425581	0.57±0.15
TFDM 低剂量组	5/8	828408±443526	385718±248041	0.38±0.17 ^a
TFDM 中剂量组	5/8	979939±277232	363519±278603	0.31±0.20 ^a
TFDM 高剂量组	4/8	849458±501889	228237±223211	0.21±0.19 ^b
辛伐他汀组	3/8	778007±225602	208739±191529	0.18±0.13 ^b

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与模型组比较。Δ 指分子为有斑块的小鼠数目,分母为本组的小鼠数目。

2.4 TFDM 对小鼠主动脉 ICAM-1、VCAM-1 和 PCNA 表达的影响

PCNA 主要在细胞核表达,细胞核被染成棕色的为阳性细胞,细胞核被染成蓝色的为阴性细胞。ICAM-1、VCAM-1 主要在胞浆中表达,胞浆呈棕黄色的为阳性细胞。免疫组织化学染色显示,模型组小鼠主动脉 VCAM-1、ICAM-1 的表达量与正常对照组相比显著增加($P<0.01$);与模型组相比,TFDM 中、

高剂量组和辛伐他汀组均能抑制 VCAM-1 的表达,TFDM 低、中、高剂量组和辛伐他汀组均能抑制 ICAM-1 的表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且呈现一定的剂量依赖性变化。模型组小鼠主动脉 PCNA 的表达量与正常对照组相比显著增加($P<0.01$);与模型组比较,TFDM 中、高剂量组和辛伐他汀组可以显著抑制 PCNA 的表达($P<0.01$),TFDM 低剂量组也有所降低,呈现一定的剂量依赖性变化(图 2 和 3)。

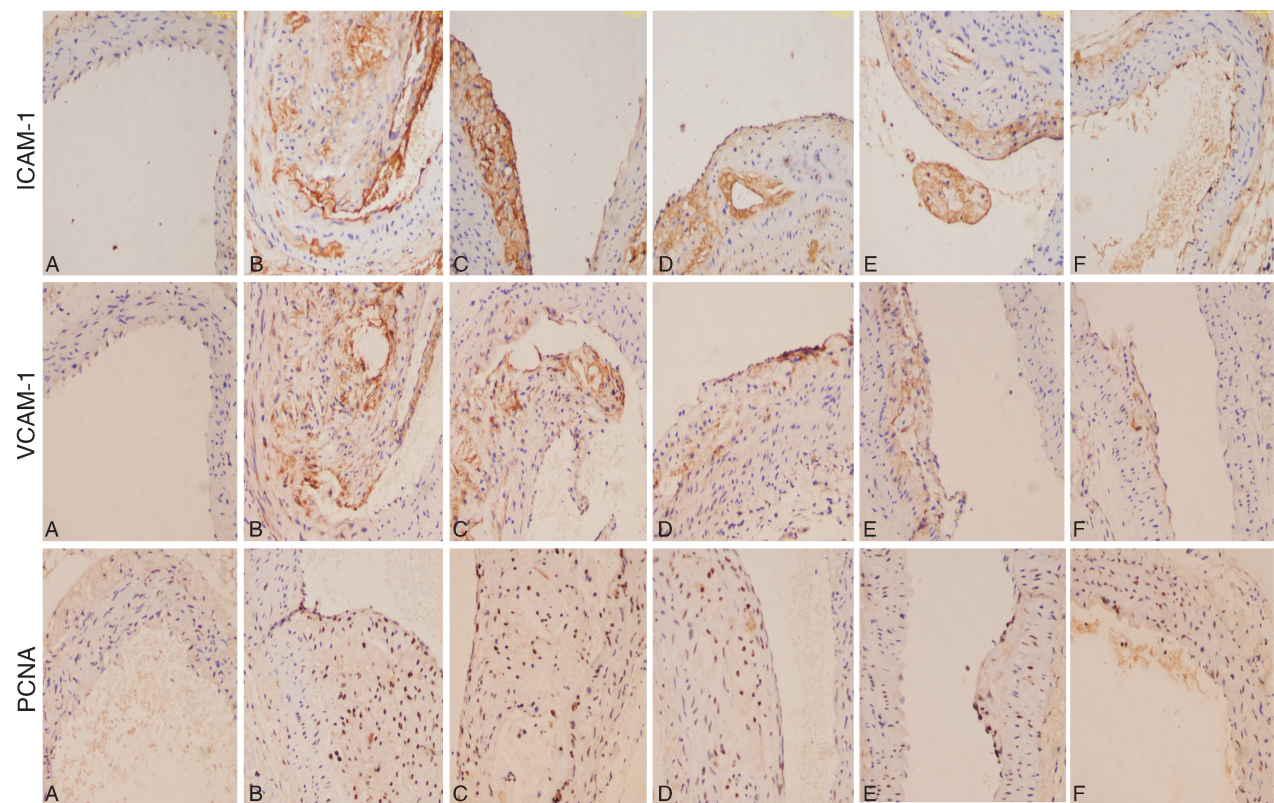


图 2. 免疫组织化学染色检测 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉组织 ICAM-1、VCAM-1 和 PCNA 的表达(200×) A 为正常对照组,B 为模型组,C 为 TFDM 低剂量组,D 为 TFDM 中剂量组,E 为 TFDM 高剂量组,F 为辛伐他汀组。

Figure 2. The expression of ICAM-1, VCAM-1 and PCNA in aortic tissue of ApoE^{-/-} mice was detected by immunohistochemical staining(200×)

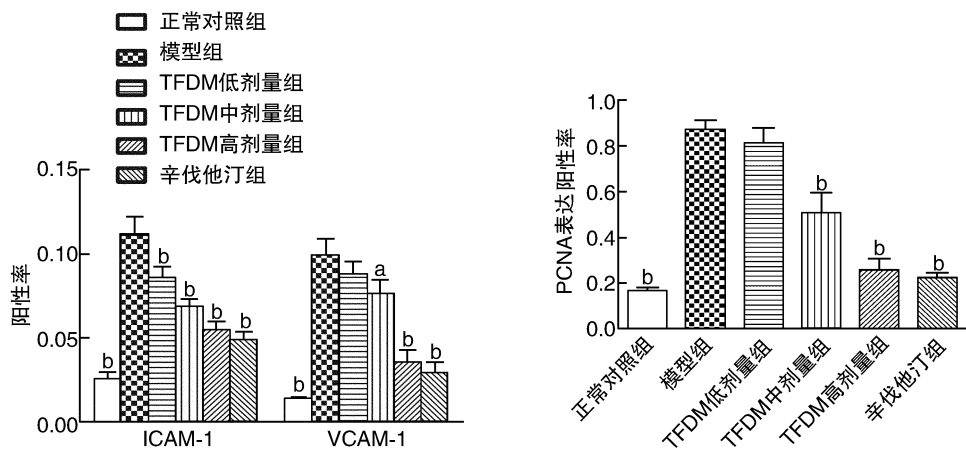


图 3. TFDM 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉 ICAM-1、VCAM-1 和 PCNA 表达的影响 a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与模型组比较。

Figure 3. Effects of TFDM on ICAM-1, VCAM-1 and PCNA expression in ApoE^{-/-} mice

3 讨论

本研究通过利用高脂饲料喂养易自发形成 As 的 ApoE^{-/-}小鼠建立合适的 As 模型,探讨 TFDM 对 As 病变的影响及作用机制。As 是一种慢性炎症过程,各种危险因素使血管内皮受损,脂质和炎症细胞聚集,同时血管平滑肌细胞增殖和细胞外基质分泌增多在受损的血管内皮下形成斑块。

大量实验性研究和流行病学调查显示 As 的发生发展与血脂紊乱密切相关^[10-11]。本研究中,TFDM 可能通过降低血浆中 TG、LDLC 来达到干预 As 病变发展的作用,对降低 TC 和升高 HDLC 的作用并不明显。其调节血脂紊乱的作用与辛伐他汀相似。主动脉病理学检查也证实 TFDM 具有抑制 As 病变发展的作用。

As 病变不仅有血脂紊乱,还是一种慢性炎症过程^[12]。As 早期单核细胞等炎症细胞黏附于受损的内皮细胞,而 ICAM-1 和 VCAM-1 在这一过程中发挥着重要作用。ICAM-1 和 VCAM-1 是存在于细胞表面的一种糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族类黏附分子,正常情况下在血管内皮不表达或仅有微弱地表达;病理状态下,病变内皮在各种致炎因子刺激下黏附分子大量表达,介导单核细胞、淋巴细胞等慢性炎症细胞黏附于血管内皮细胞并迁移至病变内皮下,促进 As 病变的发生发展^[13-14]。本研究结果发现,模型组小鼠主动脉病变中 ICAM-1 和 VCAM-1 高表达,而 TFDM 各剂量组可不同程度地抑制其表达,且对黏附分子表达的抑制作用与辛伐他汀相似,说明 TFDM 可以通过抑制黏附分子 ICAM-1 和 VCAM-1 的表达,减轻炎症反应,从而抑制 As 病变的发生发展。

PCNA 是一种细胞核内酸性蛋白质,在细胞分裂时协调 DNA 引导链和后随链的合成,对细胞分裂及增殖起重要作用。检测血管壁 PCNA 的表达,能较好地反应血管细胞的增殖活性^[12]。本研究结果发现,模型组小鼠主动脉病变中 PCNA 高表达,说明血管细胞正处于增殖状态,TFDM 各剂量组可不同程度地抑制其表达且作用效果与辛伐他汀无显著性差异,说明 TFDM 具有抑制血管细胞增殖的作用。

以上结果表明,TFDM 可能通过调节脂质代谢,减轻炎症反应,抑制血管细胞增殖来达到阻止 As 的发生和发展。

【参考文献】

- [1] 杨丽娜,邢建国,何承辉,等. 维药香青兰的化学成分与药理作用评价[J]. 世界临床药物, 2013, 34(4): 226-231.
- [2] 杨彩玉,安希文,付伟,等. 香青兰总黄酮对大鼠离体胸主动脉的舒张作用[J]. 生物物理学报, 2010, 26(4): 334-340.
- [3] 曹文疆,彭克军,袁勇,等. 香青兰总黄酮抗大鼠动脉粥样硬化作用的初步研究[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(19): 1570-572.
- [4] 康小龙,邢建国,何承辉,等. 香青兰提取物滴丸对心肌缺血大鼠血栓形成的影响[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(19): 1867-870.
- [5] 格桑曲珍,马俐,谢光辉,等. 甘草酸对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠脂质代谢及动脉粥样硬化斑块的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(2): 116-120.
- [6] 王盛,姚佳茗,郭新红,等. 香青兰总黄酮抗心肌细胞缺氧/复氧损伤作用的研究[J]. 石河子大学学报:自然科学版, 2014, 32(5): 568-573.
- [7] 曹文疆,邢建国,王新春,等. 香青兰总黄酮对 TNF- α 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 159-161.
- [8] 樊鑫梅,曹文疆,邢建国,等. 香青兰总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. 中成药, 2013, 8(35): 1625-629.
- [9] 胡娜,曹文疆,袁勇,等. 香青兰总黄酮对血管紧张素 II 诱导血管平滑肌细胞增殖与迁移的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(7): 24-27.
- [10] Gleissner CA, Leitinger N, Ley K. Effects of native and modified low-density lipoproteins on monocyte recruitment in atherosclerosis[J]. Hypertension, 2007, 50(2): 276-283.
- [11] Baila-Rueda L, Cenarro A, Lamiquiz-Moneo I, et al. Bile acid synthesis precursors in subjects with genetic hypercholesterolemia negative for LDLR/APOB/PCSK9/APOE mutations. Association with lipids and carotid atherosclerosis[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2017, 169: 226-233.
- [12] 杨润梅,李金莲,高南南,等. 豚鼠早期动脉粥样硬化模型的建立、机制研究及与小鼠模型比较[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(2): 285-289.
- [13] Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, et al. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis[J]. J Clin Invest, 2001, 107(10): 1255-262.
- [14] Xiao Y, Wang YC, Li LL, et al. Lactones from Ligusticum chuanxiong Hort. reduces atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice via inhibiting over expression of NF- κ B-dependent adhesion molecules[J]. Fitoterapia, 2014, 95: 240-246.

(此文编辑 文玉珊)