

[文章编号] 1007-3949(2006)14-04-0317-04

• 实验研究 •

葛根总黄酮对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠 动脉粥样硬化斑块形成的影响

武迎¹, 王绿娅², 张慧信¹, 王伟³, 方微¹, 王伟¹, 肖磊¹

(1. 首都医科大学附属北京安贞医院病理科; 2. 北京市心肺血管疾病研究所动脉粥样硬化研究室;

3. 北京中医药大学, 北京市 100029)

[关键词] 病理学与病理生理学; 葛根总黄酮; 血清学与病理学检查; 动脉粥样硬化斑块; 血脂; 载脂蛋白 E 基因缺陷; 小鼠

[摘要] 目的 探讨葛根总黄酮对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠主动脉窦动脉粥样硬化斑块形成的影响。方法 将载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠随机分为模型组、葛根总黄酮低剂量组、葛根总黄酮高剂量组及阿托伐他汀阳性药物组。常规生物化学法测定血清总胆固醇、甘油三酯及高密度脂蛋白胆固醇水平; 采用主动脉根部连续石蜡切片、苏木素伊红染色观察组织形态学改变, 测定载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠主动脉窦动脉粥样硬化斑块大小、动脉粥样硬化斑块与管腔面积比。结果 4 组小鼠共检出斑块 65 个, 4 组虽都有典型的粥样斑块或/及纤维斑块等中晚期动脉粥样硬化病变形成, 但组织学观察发现模型组部分斑块体积较大, 汇合成片, 管壁弥漫性增厚, 管腔较狭窄, 而葛根总黄酮治疗组及阿托伐他汀阳性药物组动脉粥样硬化斑块病变较局限, 管腔狭窄程度较轻, 并且葛根总黄酮高、低剂量组及阿托伐他汀阳性药物组斑块面积与管腔面积之比值显著低于模型组(分别为 $0.11\% \pm 0.04\%$ 、 $0.27\% \pm 0.04\%$ 和 $0.76\% \pm 0.33\%$, $P < 0.01$), 葛根总黄酮高剂量组斑块面积与管腔面积比值显著低于葛根总黄酮低剂量组($P < 0.01$)。结论 葛根总黄酮一定程度抑制载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化斑块进展, 该作用可能与降低小鼠血脂作用无明显关系。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Total Flavone of Radix Puerariae on Atherosclerotic Plaque Formation of Apolipoprotein E Gene Deficient Mice

WU Ying¹, WANG LuYa², ZHANG HuiXin¹, WANG Wei³, FANG Wei¹, WANG Wei, and XIAO Lei

(1. Department of Pathology, Affiliated Beijing Anzhen Hospital of Capital Medical University; 2. Beijing Institute of Heart, Lung and Blood Vessel Diseases; 3. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Total Flavone of Radix Puerariae; Atherosclerosis; Blood Lipid; Apolipoprotein E Gene Deficient Mice; Aortic Sinus; Atherosclerotic Plaque

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of total flavone of radix puerariae on atherosclerotic plaque formation of aortic sinus in apolipoprotein E gene deficient ($ApoE^{-/-}$) mice. **Methods** 32 $ApoE^{-/-}$ mice were divided randomly into four groups: model group, total flavone of radix puerariae low-dosage group (15 mg/kg everyday), total flavone of radix puerariae high-dosage group (85 mg/kg everyday) and atorvastatin calcium positive control group (5 mg/kg everyday). There were 8 mice in each group. The treatment group was stomach perfusion with relevant drug, the model group was stomach perfusion with equal amount of normal saline, and both group were medicated for 12 weeks and were fed with general diet. The routine biochemical method was used to measure total cholesterol, triglyceride and high density lipoprotein cholesterol in serum; and the serial paraffin section and Hematoxylin and eosin (HE) staining of aortic root were used to observe the histomorphological change of aortic sinus and measure the size of aortic sinus plaque in $ApoE^{-/-}$ mice. **Results** A total of 65 plaques were detected in four groups.

Despite the typical middle/advanced pathological changes of aortic sinus (such as fibrous plaque and/or atheromatous plaque), four groups were different in histological observation. In model group, some plaques were bigger, merged into flake, aortic wall thickened diffusively, aortic cavity was narrower. In total flavone of radix puerariae treatment group and atorvastatin calcium positive control group, the aortic sinus had a more limited plaque lesion and a slighter narrowing of aortic cavity. The ratio of plaque area to aortic cavity area was significantly smaller in total flavone of radix puerariae high-dosage group, total flavone of radix puerariae low-dosage group and atorvastatin calcium positive control group than that in model group, and was significantly smaller in total flavone of radix puerariae high-dosage group than that in total flavone of radix puerariae low-dosage group ($P < 0.01$).

[收稿日期] 2005-07-20

[修回日期] 2006-03-13

[作者简介] 武迎, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为心血管病理, 联系电话为 13910632488, E-mail 为 ying95@hotmail.com。王绿娅, 研究员, 研究方向为动脉硬化性疾病的发生发展机制, 联系电话为 010-64456436。张慧信, 硕士研究生, 主任医师, 研究方向为心血管病理, 联系电话为 010-64456323。

Conclusions Total flavone of radix puerariae can inhibit to some extent the progress of atherosclerotic plaque in ApoE^{-/-} mice, which might not be significantly related to its effect of decreasing mice blood lipid.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是严重危害人类健康的主要疾病之一,发病率呈上升趋势,发病年龄年轻化,目前缺乏有效的治疗措施。本研究前期实验证实,葛根黄酮可明显抑制家兔髂动脉球囊损伤后再狭窄^[1],但其是否具有抑制As病变进展的作用,尚未见报道。本课题拟采用载脂蛋白E基因缺陷(apolipoprotein E gene deficient, ApoE^{-/-})小鼠为As动物模型,观察葛根总黄酮对小鼠动脉粥样硬化病变进展的影响,为临床防治动脉粥样硬化提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

载脂蛋白E^{-/-}小鼠(购自北京大学医学部实验动物中心)32只,雄性,8周龄,体重21±3g,随机分4组:葛根总黄酮低剂量组(给予葛根总黄酮每天15mg/kg)、葛根总黄酮高剂量组(给予葛根总黄酮每天85mg/kg)、阿托伐他汀阳性药物组(给予阿托伐他汀每天5mg/kg)及模型组(给予相应生理盐水)。C57BL/6小鼠(购自北京大学医学部实验动物中心)2只,作为正常对照组(给予相应生理盐水)。均为灌胃处理,普通饮食饲养,自由饮水。葛根总黄酮由西安禾烁植物化学工业公司提供。

1.2 标本处理

实验第12周,小鼠经0.5~1.0mL/只1%戊巴比妥腹腔麻醉,摘眼球放血处死(其中低剂量组1只小鼠因脑水肿死亡),小鼠经生理盐水灌洗及4%多聚甲醛灌注后,解剖小鼠,取心脏连主动脉,剥离血管外附着组织后,4%甲醛固定,沿两心耳尖连线处将心脏切成两部分,下半部分弃去不要,将心脏上半部分常规脱水,石蜡包埋,连续切片,切片厚5μm,显微镜下选择切片,每只小鼠约切片40张左右。眼眶取血后,血样离心分离小鼠血清,测定血浆总胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDLC)。

1.3 主动脉窦动脉粥样硬化斑块大小的评价

小鼠主动脉窦切片每间隔8张取1张,共取6张,做HE染色,光镜观察As病变的组织学形态;用CIMAS多功能真彩色病理图像分析软件作形态测量分析,测量指标为血管管腔面积、粥样斑块面积和粥样斑块面积与管腔面积之比,取其均值进行统计学分析。

1.4 血脂水平的测定

测定血清总胆固醇(CHOD-PAA法)、甘油三酯(GPO-PAP法)和HDL(PTA-Mg²⁺沉淀法),每次测定时,加测质控血清。

1.5 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS10.0统计软件进行组间 t 检验。

2 结果

2.1 各组主动脉大体观察结果

实验第12周(鼠龄20周)时,肉眼观察正常对照组主动脉弓至腹主动脉壁光滑,有弹性,未见动脉粥样硬化斑块形成,其余4组载脂蛋白E^{-/-}小鼠主动脉壁均有一定数量的斑块形成,斑块多位于主动脉弓分支开口处、胸主动脉及腹主动脉,呈灰白或黄白色,大小约1~3mm,质较硬,模型组小鼠主动脉壁弹性较差,易断裂,葛根总黄酮治疗组与阿托伐他汀阳性药物组小鼠主动脉壁弹性较好,斑块较少。

2.2 各组小鼠主动脉窦组织学观察结果

模型组、葛根总黄酮高、低剂量组及阿托伐他汀阳性药物组共检出斑块65个。模型组有早期脂纹病变6个(9.23%),纤维斑块+粥样斑块8个(12.31%),葛根总黄酮高剂量组有早期脂纹病变14个(21.54%),纤维斑块+粥样斑块4个(6.15%),葛根总黄酮低剂量组有早期脂纹病变6个(9.23%),纤维斑块+粥样斑块7个(10.77%),阿托伐他汀阳性药物组有早期脂纹病变17个(26.15%),纤维斑块+粥样斑块3个(4.62%)。4组小鼠都有典型的粥样斑块或/及纤维斑块等中晚期As病变形成,但模型组与葛根总黄酮高、低剂量组及阿托伐他汀阳性药物组比较,部分斑块体积较大,汇合成片,管壁弥漫性增厚,管腔狭窄较明显(图1),提示葛根总黄酮一定程度可抑制动脉粥样硬化斑块的进展。

2.3 各组小鼠主动脉斑块面积与管腔面积比值的比较

4组管腔面积差异无显著性($P > 0.05$)。葛根总黄酮高、低剂量组及阿托伐他汀阳性药物组斑块面积和斑块面积/管腔面积显著低于模型组($P < 0.01$),葛根总黄酮高剂量组斑块面积和斑块面积/管腔面积显著低于葛根总黄酮低剂量组($P < 0.01$),提示葛根总黄酮可明显减少动脉粥样硬化斑块面积,并且这种作用具有一定的量效关系(表1)。

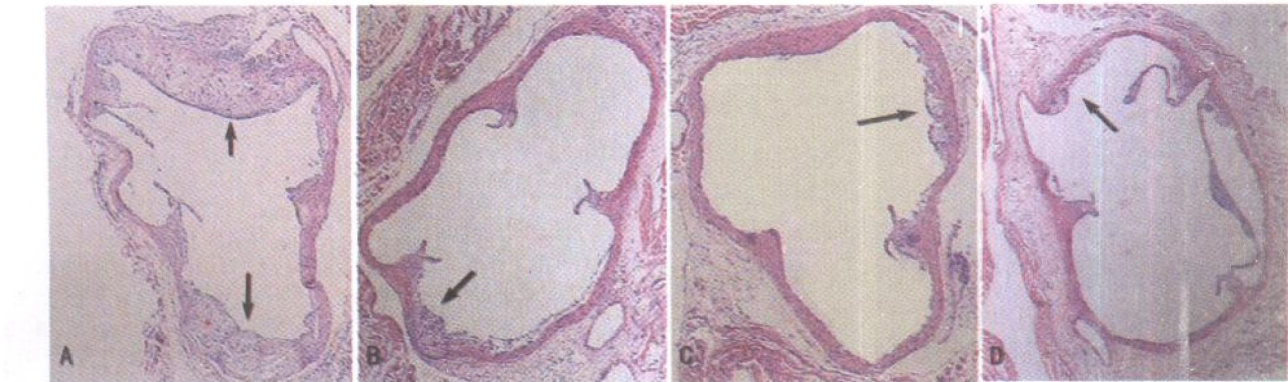


图 1. 载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠主动脉窦组织学观察(HE × 40) A 为模型组,可见脂纹及 2 个体积较大的粥样斑块形成,斑块突入管腔(箭头)致管腔狭窄。B 为葛根总黄酮低剂量组,局部内膜内皮下较多泡沫细胞聚集,纤维斑块形成,斑块向外膜突出(箭头),无明显管腔狭窄。C 为葛根总黄酮高剂量组,局部内膜隆起,脂纹形成(箭头)。D 为阿托伐他汀阳性药物组,局部内膜隆起,脂纹形成(箭头)。

表 1. 载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠主动脉窦动脉粥样斑块面积及管腔面积的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n [△]	管腔面积 (μm^2)	斑块面积 (μm^2)	斑块面积/ 管腔面积
模型组	5/8	213 401 ± 48 968	158 918 ± 67 548	0.76 ± 0.33
葛根低剂量组	5/7	229 835 ± 37 947	55 411 ± 13 625 ^a	0.27 ± 0.04 ^a
葛根高剂量组	4/8	263 658 ± 48 682	30 135 ± 10 746 ^{ab}	0.11 ± 0.04 ^{ab}
阿托伐他汀组	3/8	247 856 ± 47 367	19 177 ± 14 211 ^a	0.07 ± 0.02 ^a

$P < 0.01$, a 为与模型组比较, b 为与葛根低剂量组比较。△分子为有斑块的小鼠数目,分母为本组小鼠数目。

2.4 葛根总黄酮对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠血脂的影响

阿托伐他汀阳性药物组血清总胆固醇和甘油三酯明显低于模型组, HDLC 明显高于模型组($P < 0.01$)。葛根高剂量组、低剂量组与模型组之间血清总胆固醇差异无显著性($P > 0.05$); 3 组血清甘油三酯差异无显著性($P > 0.05$); 3 组血清 HDLC 差异无显著性($P > 0.05$), 提示本实验中葛根总黄酮抑制动脉粥样硬化斑块的作用可能与降血脂作用无关(表 2)。

表 2. 葛根总黄酮对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	总胆固醇(mg/L)	甘油三酯(mg/L)	HDLC(mg/L)
模型组	8	3 955 ± 563	195 ± 307	1 207 ± 257
葛根低剂量组	7	4 176 ± 545	1 726 ± 354	1 233 ± 257
葛根高剂量组	8	4 327 ± 717	1 957 ± 378	1 135 ± 233
阿托伐他汀组	8	2431 ± 482	1 271 ± 473 ^a	1 703 ± 157 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

3 讨论

动脉粥样硬化是指大中型动脉内膜和内膜下发生脂质沉着,并伴有中层平滑肌细胞向内膜移行增殖,内膜增厚而形成的粥样病灶或纤维脂质斑块。动脉粥样硬化病变的进展有着复杂的演变过程,不同发展阶段的 As 病变有以下几种组织学表现^[2]: 脂纹、纤维斑块、粥样斑块及复合病变。

以往的 As 动物模型大多以高脂肪、高胆固醇膳食负荷喂养,其 As 病理变化机制与人类 As 的形成有较大的差异。载脂蛋白 E 作为一种配体参与受体介导的载脂蛋白清除过程,载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠采用了同源重组的基因打靶技术使载脂蛋白 E 基因失活,动物可在正常饲料喂养下产生严重的高胆固醇血症,并自发形成 As 斑块,其斑块分布及病理特征与人类 As 斑块极为相似,故载脂蛋白 E^{-/-}小鼠是研究 As 病程及干预效果的较好的动物模型^[3]。本研究采用载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠为实验动物,以斑块面积与血管腔面积比来客观衡量动脉粥样硬化发展程度,本实验中正常对照组 C57BL/6 小鼠未见动脉粥样硬化斑块形成,而其余 4 组载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠均有不同程度动脉粥样硬化斑块形成,证实该动物模型是成功的。

葛根为豆科植物野葛或甘葛藤的干燥根,含有黄酮类物质。TFRP 为葛根的有效成分,包括黄豆甾元、大豆甾元 4',7 二葡萄糖甾和葛根素等,其中葛根素和黄豆甾元等是其主要有效成分。葛根的主要活性成分为异黄酮类化合物。As 初期病变主要由平滑肌细胞移行至内膜并发生增殖开始,早期为极小的黄色隆起的脂肪条纹,进而演变为呈白色隆起

的粥样硬化斑、纤维斑,一部分病变演变为伴血栓形成钙化溃疡的复合病变。本实验观察发现,模型组、葛根总黄酮高、低剂量组及阿托伐他汀阳性药物组虽都有典型的粥样斑块或/及纤维斑块等中晚期 As 病变形成,但模型组部分斑块体积较大,汇合成片,管壁弥漫性增厚,管腔较狭窄,而葛根总黄酮治疗组及阿托伐他汀阳性药物组斑块病变则较局限,管腔狭窄程度较轻,葛根总黄酮治疗组斑块面积与管腔面积之比显著低于模型组,提示葛根总黄酮在一定程度上抑制了晚期 As 斑块的进展,具有一定抗 As 作用。

葛根总黄酮由 30 多种活性物质组成,其药理作用可能是多方面及多靶点的,葛根素是 TFRP 主要有效成分之一,以往研究发现葛根素具有一定抗 As 作用,其作用机制可能是保护血管内皮细胞^[4,5]、抗氧化、清除氧自由基^[6,7]、升高一氧化氮合酶活性调节血管内皮依赖性舒张因子^[8]、阻断 β 受体和 α 受体^[9] 以及选择性雌激素受体调节剂 (SERM) 作用^[10]。本实验葛根素在 TFRP 抗 As 的作用中是否起主要作用,尚需进一步实验研究。大量研究证实血脂升高和脂蛋白代谢紊乱是 As 发生、发展的重要因素。葛根总黄酮对人体或实验动物血脂的影响,相关报道较少,但葛根素作为葛根总黄酮主要有效成分,高尔等^[8]报道葛根素及乳化葛根素均有调节血管内皮依赖性舒张因子的作用,可降低高酯血症家兔血脂。周晶华等^[11]报道葛根素有降低糖尿病患者胆固醇、升高高密度脂蛋白以及改善血液流变学指标作用。本实验中 3 组小鼠血脂检测差异无显

著性,我们推测本实验中葛根总黄酮抑制 As 斑块进展的作用可能与降低小鼠血脂作用无明显关系。

本实验证实葛根总黄酮在一定程度上抑制了晚期 As 斑块的进展,具有抗 As 的作用,但其作用机制还需要进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 刘舒,王绿娅,王伟,吕树铮,勇强,石风茹,等. 葛根素抑制家兔髂动脉球囊损伤后再狭窄[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (2): 159-161
- [2] Wood KM, Cadogan MD, Ramshaw AL, Parums DV. The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis[J]. *Histopathology*, 1993, 22: 437-444
- [3] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14: 133-140
- [4] 丁继军,章国华,沈茜,秦永文. 葛根素对培养人主动脉内皮细胞脂质过氧化的保护作用[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20 (4): 240-242
- [5] 李永红,李志强,李震海,李琰,董果雄. 葛根素对球囊损伤血管内皮后血小板活化及血管紧张素 iv 型受体 mRNA 变化的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2003, 31 (5): 369-372
- [6] 朱智彤,姚智,李会强,姜建石,卢奕. 葛根素对乳鼠心肌细胞缺氧复氧时脂质过氧化损伤的保护作用[J]. 中草药, 2002, 33 (4): 343-346
- [7] 方放治,戴德战,王自正,王书奎,杨薇. 葛根素对抗 H_2O_2 引起血管平滑肌细胞凋亡及坏死[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33 (3): 241-244
- [8] 高尔,王金红,李洪军,孙善明,韩慧蓉. 乳化葛根素对高脂血症家兔血清 NO 及 PGI_2 的影响[J]. 潍坊医学院学报, 2001, 23 (1): 1-3
- [9] 刘强,詹丽芬,李智,丛华,刘承恩. 葛根素对大鼠豚鼠主动脉肺动脉血管平滑肌的作用[J]. 中国医科大学学报, 2002, 31 (6): 401-403
- [10] 刘舒,韩静,王绿娅. 黄酮、异黄酮药物抑制肿瘤细胞增殖作用的最进展[J]. 中国药学杂志, 2004, 39 (1): 4-7
- [11] 周晶华,周辉,刘先荣,郭富山,刘萍,李庆新. 普乐林注射液对血脂和血液流变学的影响[J]. 医学理论与实践, 2000, 13 (1): 40

(此文编辑 朱雯霞)