

# 黄酒多酚对 LDLR<sup>-/-</sup>小鼠 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 表达和动脉粥样硬化斑块的影响

翟小亚<sup>1,2</sup>, 郭航远<sup>1,2</sup>, 池菊芳<sup>2</sup>, 季政<sup>2</sup>, 唐伟良<sup>2</sup>, 赵飞<sup>2</sup>, 蒋承建<sup>2</sup>

(1. 温州医科大学第一临床医学院, 浙江省温州市 325000;

2. 绍兴市人民医院 浙江大学绍兴医院, 浙江省绍兴市 312000)

**[关键词]** 黄酒多酚; 动脉粥样硬化; 基质金属蛋白酶 2; 基质金属蛋白酶 9; 组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1; 组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2

**[摘要]** **目的** 观察黄酒是否可以通过黄酒多酚发挥对动脉粥样硬化斑块的抑制作用并探讨其可能机制。**方法** 40 只 6 周龄雄性低密度脂蛋白受体敲除 (LDLR<sup>-/-</sup>) 小鼠, 高脂饲料喂养诱导形成动脉粥样硬化模型, 随机分为高脂对照组、瑞舒伐他汀组、黄酒多酚 10 mg/(kg·d) 组、黄酒多酚 30 mg/(kg·d) 组和黄酒多酚 50 mg/(kg·d) 组, 每组 8 只, 分别予以无菌水、10 mg/(kg·d) 瑞舒伐他汀和 10、30、50 mg/(kg·d) 黄酒多酚干预。16 周后处死小鼠, 检测血脂, 观察胸腹主动脉粥样硬化情况, Western blot 测定胸主动脉组织内基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP-1) 及组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 (TIMP-2) 的表达, 明胶酶谱法测定主动脉弓动脉粥样硬化处 MMP-2 和 MMP-9 的活性。**结果** 与高脂对照组相比, 总胆固醇 (TC) 和低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC) 在黄酒多酚组和瑞舒伐他汀组明显下降 ( $P < 0.01$ ), 甘油三酯 (TG) 在瑞舒伐他汀组明显下降 ( $P < 0.01$ ), 在黄酒多酚组差异不明显 ( $P > 0.05$ ), 在黄酒多酚组与瑞舒伐他汀组差异明显 ( $P < 0.05$ ); 5 组间高密度脂蛋白胆固醇 (HDL) 水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与高脂对照组相比, 主动脉粥样硬化面积在瑞舒伐他汀组和黄酒多酚 10、30、50 mg/(kg·d) 组分别减少 74.14%、18.51%、40.09%、38.42% ( $P < 0.01$ ), 不同浓度黄酒多酚组主动脉粥样硬化面积与瑞舒伐他汀组比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。黄酒多酚和瑞舒伐他汀均能明显抑制 MMP-2、MMP-9 的表达和活性 ( $P < 0.01$ ), 增强 TIMP-1、TIMP-2 的表达 ( $P < 0.01$ )。**结论** 黄酒多酚具有类似瑞舒伐他汀的作用, 能够调节血脂, 在抑制 MMP-2、MMP-9 表达和活性的同时增强 TIMP-1、TIMP-2 的表达, 减轻动脉粥样硬化斑块的形成, 这可能是黄酒对心血管系统的保护机制之一。

**[中图分类号]** R363

**[文献标识码]** A

## Effects of Yellow Wine Polyphenolic Compounds on Expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 and Atherosclerotic Plaques of LDLR Knockout Mice

ZHAI Xiao-Ya<sup>1,2</sup>, GUO Hang-Yuan<sup>1,2</sup>, CHI Ju-Fang<sup>2</sup>, JI Zheng<sup>2</sup>, TANG Wei-Liang<sup>2</sup>, ZHAO Fei<sup>2</sup>, and JIANG Cheng-Jian<sup>2</sup>

(1. The First Clinical Medical College of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China; 2. Shaoxing People's Hospital & Shaoxing Hospital of Zhejiang University, Shaoxing, Zhejiang 312000, China)

**[KEY WORDS]** Yellow Wine Polyphenolic Compounds; Atherosclerosis; Matrix Metalloproteinase-2; Matrix Metalloproteinase-9; Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1; Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-2

**[ABSTRACT]** **Aim** To study the possibility that yellow wine polyphenolic compounds improves the pathological changes of atherosclerosis in vivo. **Methods** Six weeks old LDL receptor knock out mice ( $n = 40$ ) treated with high-fat diet were randomly allocated to five groups (8 rats in each group): high fat group, rosuvastatin intervention group,

**[收稿日期]** 2013-06-07

**[基金项目]** 卫生部科学研究基金-浙江省医药卫生重大科技计划项目 (WKJ2011-2-018); 浙江省自然科学基金资助项目 (Y2100535)

**[作者简介]** 翟小亚, 硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化的基础研究, E-mail 为 zhaixiaoya66@163.com。通讯作者郭航远, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心机病、冠心病和高血压的基础和临床研究, E-mail 为 ghangyuan@hotmail.com。池菊芳, 博士, 副主任医师, 主要从事冠心病、高血压病、心力衰竭、心律失常等临床和基础研究。

yellow wine polyphenolic compounds 10 mg/(kg · d) intervention group, yellow wine polyphenolic compounds 30 mg/(kg · d) intervention group, yellow wine polyphenolic compounds 50 mg/(kg · d) intervention group, they received by sterile water, 10 mg/(kg · d) rosuvastatin and yellow wine polyphenolic compounds with dose of 10, 30, 50 mg/(kg · d) dissolved in sterile water, respectively. High fat diet were given to establish the mouse model with atherosclerosis. After 16 weeks, they were sacrificed. The levels of plasma lipids in serum were examined. The morphological changes of aorta artery were observed under microscope. The expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) were determined by Western blot. The activation of MMP-2, MMP-9 were determined by Gelatin Zymography. **Results** Compared to high fat group, the levels of total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDLC) and triglyceride (TG) were significantly decreased in rosuvastatin intervention group ( $P < 0.01$ ); except for TG, plasma TC and LDLC levels were significantly decreased in yellow wine polyphenolic intervention compounds groups ( $P < 0.01$ ). The levels of plasma TC, LDLC and TG showed significant difference between yellow wine polyphenolic compounds intervention groups and rosuvastatin intervention group ( $P < 0.05$ ). No significant difference of plasma high density lipoprotein cholesterol (HDL) level among groups were observed ( $P > 0.05$ ). Compared to high fat group, the atherosclerosis lesion area in rosuvastatin intervention group and yellow wine polyphenolic compounds 10, 30, 50 mg/(kg · d) intervention groups decreased by 74.14%, 18.51%, 40.09%, 38.42% ( $P < 0.01$ ), respectively. Use of yellow wine polyphenolic compounds and rosuvastatin significantly reduced the atherosclerosis lesion area ( $P < 0.01$ ). The yellow wine polyphenolic compounds and rosuvastatin could down-regulate MMP-2, MMP-9 expression and activities ( $P < 0.01$ ), whereas expression of TIMP-1, TIMP-2 were up-regulated ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The yellow wine polyphenolic compounds is similar to the role of rosuvastatin, which can improve dyslipidemia, reduce the expression and activities of MMP-2, MMP-9, at the same time promote the expression of TIMP-1, TIMP-2, improve the pathologic changes of atherosclerosis, indicating that they have benefic effects on cardiovascular system.

红酒中富含的多酚是红酒发挥心血管保护作用的主要有效成分,其中包括儿茶素、表儿茶素、没食子酸、阿魏酸、咖啡酸、花青素以及白藜芦醇等<sup>[1,2]</sup>。作为我国的民族特产绍兴黄酒,它是由糯米、小麦、米曲霉和酵母等历经 80 余天发酵而来,富含与红酒相似的多酚<sup>[3]</sup>。我们前期在低密度脂蛋白受体基因敲除 (LDL receptor knockout, LDLR<sup>-/-</sup>) 小鼠体内对黄酒进行了一系列研究<sup>[4]</sup>,发现适量饮用黄酒能在病变早期显著抑制其动脉粥样斑块的形成,其干预效果甚至优于红葡萄酒。我们推测黄酒对心血管的保护作用是否可以通过富含的多酚起作用。目前临床上预防动脉粥样硬化的主要有效手段是利用他汀类药物降低外周血胆固醇,进而延缓斑块病变的进展<sup>[5]</sup>。他汀类药物尤其是瑞舒伐他汀、阿托伐他汀等,不仅可以有效降低血脂水平,还可以通过改善内皮功能、减少血管平滑肌细胞过度增殖和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 过度表达、增加组织型基质金属蛋白酶抑制剂 (tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, TIMP) 的表达而抑制粥样斑块的进展<sup>[6,7]</sup>。因此我们本研究将瑞舒伐他汀作为阳性对照,探讨富含多酚的一类饮品黄酒是否可以通过黄酒多酚发挥对粥样斑块的抑制作用,黄酒多酚是否具有类他汀作用来保护心血管系统。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验试剂

黄酒多酚由上海中药制药技术有限公司 (国家中药制药工程技术研究中心) 提供,瑞舒伐他汀钙片由英国阿斯利康公司提供,兔抗 MMP-2、MMP-9 多克隆抗体、鼠抗 TIMP-2 单克隆抗体、明胶购自 Abcam 公司,兔抗 TIMP-1 多克隆抗体购自 Abbiotec 公司,IgG 标记的山羊抗小鼠或山羊抗兔二抗购自 Jackson Immuno Reserech 公司,其它免疫印迹相关试剂购自江苏碧云天生物技术研究,其它化学试剂均为进口或国产分析纯。

### 1.2 实验动物及分组

健康雄性 6 周龄 LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠 (遗传背景 C57BL/6J 10 代后) 40 只,体重 20 ~ 25 g。饲养条件:SPF 级环境,室温 25℃ ± 2℃,湿度 55% ± 3%,光照和黑暗循环时间 12 h。动物实验得到了温州医学院和绍兴市人民医院实验动物管理委员会的批准。将上述小鼠随机分为高脂对照组、瑞舒伐他汀组、黄酒多酚 10 mg/(kg · d) 组、黄酒多酚 30 mg/(kg · d) 组和黄酒多酚 50 mg/(kg · d) 组,每组 8 只。标准饲料适应性喂养一周后,各组在给予高脂饲料 (标准饲料 + 10% 油脂 + 1.25% 胆固醇) 喂养的同时每天早晚两次分别予以无菌水、10 mg/

( $\text{kg} \cdot \text{d}$ ) 瑞舒伐他汀和 10、30、50  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  黄酒多酚干预,其中瑞舒伐他汀和黄酒多酚以上述浓度溶于无菌水中。于相同的生活环境连续干预 16 周。整个实验中未有动物死亡。

黄酒多酚的用量是根据美国食品药品监督管理局关于每天饮用酒精 12~24 g 为适量饮酒的标准,每天饮用 200 mL 酒精度为 12% 的绍兴黄酒为适量饮酒。绍兴黄酒多酚含量约为 1.0 g/L,故人体每天摄入的黄酒多酚约为 200 mg,按 70 kg 体重计算,黄酒多酚摄入量约为 2.86  $\text{mg}/\text{kg}$ 。按 9.1 的系数折算,体重为 20~25 g 小鼠的多酚干预中等剂量约为 26  $\text{mg}/\text{kg}$ ,故在本研究中选择 30  $\text{mg}/\text{kg}$  作为多酚干预的中等剂量。

### 1.3 血样采取和血脂检测

连续干预 16 周、禁食 12 h,乙醚麻醉后打开胸腔,经心脏右心房取血。血液标本经 4000  $\text{r}/\text{min}$  离心 10 min 后分离血清,−80℃ 冰箱保存用于血脂检测。全自动生化分析仪(Abbott Aeroset TM, USA)检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)水平。

### 1.4 主动脉粥样硬化斑块面积的测定

采血后经左心室予预冷 PBS 冲洗,从近段主动脉约 1 mm 处离断血管,清除胸腹主动脉附属脂肪组织后,纵向分离血管至肾动脉,4% 甲醛固定 24 h 后予 70% 乙醇漂洗 30 s,苏丹 IV 染色 15 min,80% 酒精处理,20 min 流水冲洗 1 h。XTZ-E 体视显微镜外接尼康 D60 数码相机,拍照胸腹主动脉,动脉粥样硬化面积用 Image pro-Plus 6.0 分析。

### 1.5 Western blot 检测胸主动脉组织内 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 及 TIMP-2 的表达

取小鼠胸主动脉,剪碎采取液氮组织匀浆,加入蛋白裂解液裂解 30 min,于 4℃、12000  $\text{r}/\text{min}$  离心 10 min,取上清,用 BCA 法蛋白定量。样品加入 5× 上样缓冲液,沸水浴 5 min,将标本放置 −80℃ 冰箱保存备用。SDS-PAGE 胶每孔加入蛋白(30  $\mu\text{g}$  MMP-2、MMP-9,50  $\mu\text{g}$  TIMP-1、TIMP-2)后,60 V 浓缩胶,100 V 分离胶,然后将电泳后的蛋白质转移到孔径 0.45  $\mu\text{m}$  硝酸纤维素膜上,将膜用封闭液室温封闭 2 h,分别加入一抗 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1、TIMP-2,4℃ 孵育过夜,常温下 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,然后与相应的二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min, ECL 化学发光法检测目标蛋白。暗室柯达胶片显影, Image pro-Plus 6.0 分析。

### 1.6 明胶酶谱法测定主动脉弓动脉粥样硬化处 MMP-2 和 MMP-9 的活性

剪碎主动脉弓,液氮组织匀浆,裂解液裂解、离心后 BCA 法蛋白定量,提取 30  $\mu\text{g}$  蛋白。在含 1  $\text{mg}/\text{L}$  明胶的 10% 聚丙烯酰胺凝胶片上电泳,待溴酚蓝到达凝胶底部,停止电泳,取下凝胶用蒸馏水清洗 2 次,室温下在含 2.5% Triton X-100 洗涤缓冲液平摇 30 min 以洗脱 SDS,重复一次;加入孵育缓冲液,37℃ 摇床平摇孵育 42 h。然后避光考马斯亮兰 R250 凝胶染色 2 h,脱色液中脱色直到蓝色背景下出现白色条带,双蒸水冲洗终止脱色,用凝胶成像系统(Bio-Rad)进行拍照,用 Quantity One 4.4 定量分析。

### 1.7 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组数据间比较采用  $t$  检验,多组数据间比较用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠生长情况及血脂水平

小鼠食物摄入量、饮水量、体重增加量在各组间无显著差别。与高脂对照组比较,瑞舒伐他汀组 TG、TC、LDLC 水平降低( $P < 0.01$ ),黄酒多酚组 TC 和 LDLC 水平显著下降( $P < 0.01$ )。不同浓度黄酒多酚组 TG、TC、LDLC 水平与瑞舒伐他汀组比较差异显著( $P < 0.05$ )。与黄酒多酚 10  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  组相比,黄酒多酚 30  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  组和 50  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  组 TC、LDLC 水平差异显著( $P < 0.05$ ),后两者之间无明显差异( $P > 0.05$ )。HDLC 水平在各组之间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ;表 1)。

### 2.2 胸腹主动脉粥样硬化斑块面积

实验结束时,所有实验小鼠主动脉弓均有粥样硬化斑块形成,其中高脂对照组小鼠最为明显。与高脂对照组比较,黄酒多酚 10、30 和 50  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  组主动脉粥样硬化斑块面积分别减少了 18.51%、40.09% 和 38.42% ( $P < 0.01$ ),瑞舒伐他汀组减少了 74.14% ( $P < 0.01$ )。不同浓度黄酒多酚组主动脉粥样硬化斑块面积与瑞舒伐他汀组比较差异显著( $P < 0.01$ )。与黄酒多酚 10  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  组比较,黄酒多酚 30  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  组和 50  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  组主动脉粥样硬化斑块面积差异显著( $P < 0.01$ ),后两组之间无明显差异( $P > 0.05$ ;图 1 和图 2)。



表 1. 各组小鼠血脂水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Comparison of plasma lipid levels in each group

分 组	TG( mmol/L)	TC( mmol/L)	LDLC( mmol/L)	HDLC( mmol/L)
瑞舒伐他汀组	2. 76 $\pm$ 0. 67 <sup>b</sup>	14. 32 $\pm$ 2. 45 <sup>b</sup>	9. 59 $\pm$ 1. 81 <sup>b</sup>	5. 57 $\pm$ 0. 67
高脂对照组	4. 52 $\pm$ 0. 93	30. 73 $\pm$ 2. 92	22. 99 $\pm$ 3. 50	5. 03 $\pm$ 0. 65
黄酒多酚 10 mg/( kg · d) 组	4. 17 $\pm$ 0. 77 <sup>a</sup>	25. 28 $\pm$ 2. 46 <sup>ab</sup>	18. 98 $\pm$ 2. 17 <sup>ab</sup>	5. 21 $\pm$ 0. 41
黄酒多酚 30 mg/( kg · d) 组	3. 75 $\pm$ 0. 77 <sup>a</sup>	18. 26 $\pm$ 2. 89 <sup>abc</sup>	13. 47 $\pm$ 1. 94 <sup>abc</sup>	5. 48 $\pm$ 0. 92
黄酒多酚 50 mg/( kg · d) 组	3. 86 $\pm$ 0. 90 <sup>a</sup>	20. 09 $\pm$ 3. 48 <sup>abc</sup>	15. 23 $\pm$ 2. 58 <sup>abc</sup>	5. 36 $\pm$ 0. 72

a 为  $P < 0. 05$ , 与瑞舒伐他汀组比较; b 为  $P < 0. 01$ , 与高脂对照组比较; c 为  $P < 0. 05$ , 与黄酒多酚 10 mg/( kg · d) 组比较。

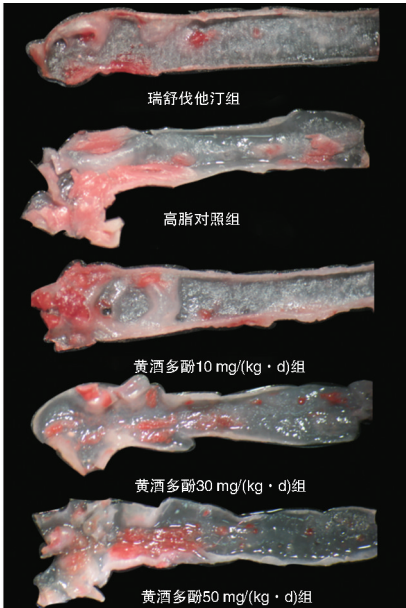


图 1. 各组主动脉大体观察

Figure 1. Morphology of the aorta artery in each group

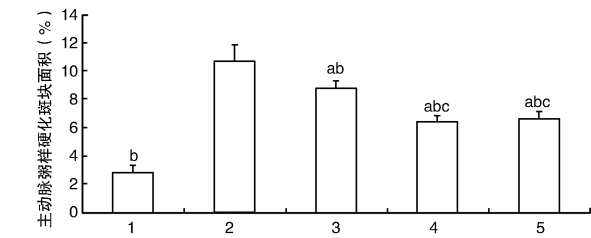


图 2. 各组主动脉粥样硬化斑块面积 1 为瑞舒伐他汀组, 2 为高脂对照组, 3 为黄酒多酚 10 mg/( kg · d) 组, 4 为黄酒多酚 30 mg/( kg · d) 组, 5 为黄酒多酚 50 mg/( kg · d) 组。a 为  $P < 0. 01$ , 与瑞舒伐他汀组比较; b 为  $P < 0. 01$ , 与高脂对照组比较; c 为  $P < 0. 01$ , 与黄酒多酚 10 mg/( kg · d) 组比较。

Figure 2. Atherosclerosis lesion areas of aorta artery in each group

### 2. 3 胸主动脉组织内 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和 TIMP-2 的表达

与高脂对照组比, 瑞舒伐他汀组和不同浓度黄酒多酚组 MMP-2 和 MMP-9 的表达被抑制, TIMP-1 和 TIMP-2 的表达有所增加 ( $P < 0. 01$ )。在不同浓

度黄酒多酚组中, 黄酒多酚 30、50 mg/( kg · d) 组作用最明显 ( $P < 0. 05$ ), 两者间差异无统计学意义 ( $P > 0. 05$ )。不同浓度黄酒多酚组 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和 TIMP-2 的表达与瑞舒伐他汀组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0. 01$  或  $P < 0. 05$ ; 图 3 和 4)。

### 2. 4 主动脉弓 MMP-2 和 MMP-9 的活性

与高脂对照相比, 瑞舒伐他汀组和黄酒多酚 10、30 和 50 mg/( kg · d) 组均能抑制 MMP-2 和 MMP-9 的活性 ( $P < 0. 01$ )。在不同浓度黄酒多酚组中, 黄酒多酚 30、50 mg/( kg · d) 组抑制作用最明显 ( $P < 0. 05$ ), 两者间差异无统计学意义 ( $P > 0. 05$ )。不同浓度黄酒多酚组 MMP-2 和 MMP-9 的活性与瑞舒伐他汀组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0. 01$  或  $P < 0. 05$ ; 图 5)。

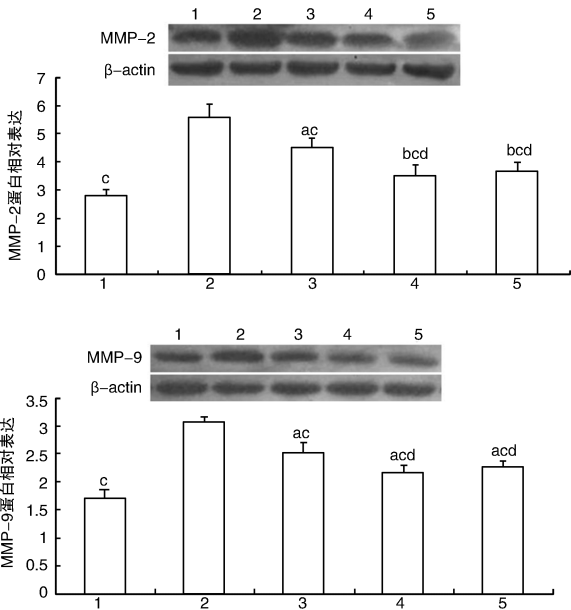


图 3. Western blot 检测各组主动脉组织内 MMP-2 和 MMP-9 的表达 1 为瑞舒伐他汀组, 2 为高脂对照组, 3 为黄酒多酚 10 mg/( kg · d) 组, 4 为黄酒多酚 30 mg/( kg · d) 组, 5 为黄酒多酚 50 mg/( kg · d) 组。a 为  $P < 0. 05$ , b 为  $P < 0. 01$ , 与瑞舒伐他汀组比较; c 为  $P < 0. 01$ , 与高脂对照组比较; d 为  $P < 0. 05$ , 与黄酒多酚 10 mg/( kg · d) 组比较。

Figure 3. Western blot analysis MMP-2 and MMP-9 protein expression of aorta in each group

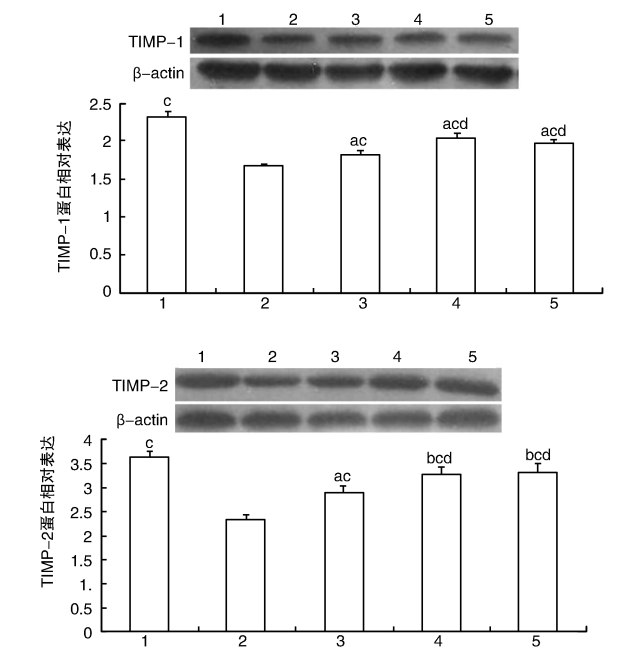


图 4. Western blot 检测各组主动脉组织内 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达 1 为瑞舒伐他汀组,2 为高脂对照组,3 为黄酒多酚 10 mg/(kg·d) 组,4 为黄酒多酚 30 mg/(kg·d) 组,5 为黄酒多酚 50 mg/(kg·d) 组。a 为  $P<0.05$ ,b 为  $P<0.01$ ,与瑞舒伐他汀组比较;c 为  $P<0.01$ ,与高脂对照组比较;d 为  $P<0.05$ ,与黄酒多酚 10 mg/(kg·d) 组比较。

Figure 4. Western blot analysis TIMP-1 and TIMP-2 protein expression of aorta in each group

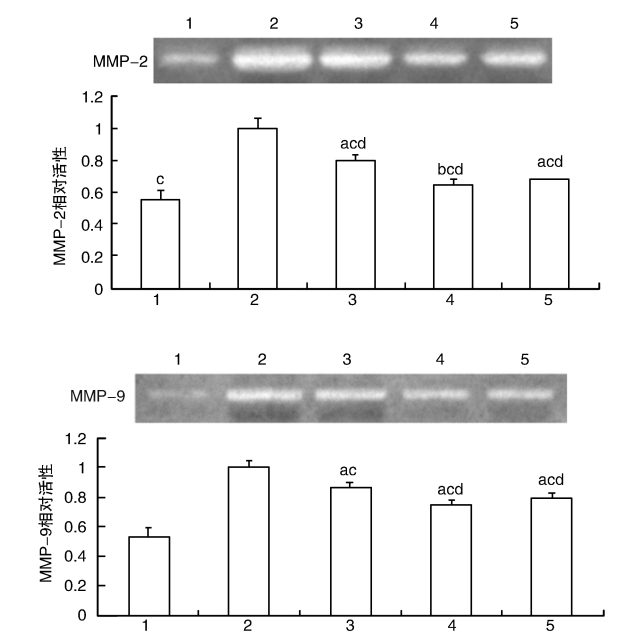


图 5. 主动脉弓 MMP-2 和 MMP-9 的活性 1 为瑞舒伐他汀组,2 为高脂对照组,3 为黄酒多酚 10 mg/(kg·d) 组,4 为黄酒多酚 30 mg/(kg·d) 组,5 为黄酒多酚 50 mg/(kg·d) 组。a 为  $P<0.05$ ,b 为  $P<0.01$ ,与瑞舒伐他汀组比较;c 为  $P<0.01$ ,与高脂对照组比较;d 为  $P<0.05$ ,与黄酒多酚 10 mg/(kg·d) 组比较。

Figure 5. The activity of MMP-2 and MMP-9 in aortic arch

### 3 讨论

越来越多的流行病学研究已经发现,规律和适度的摄入富含酚类的饮品,如红酒、脱醇红酒或者茶可以下降总体死亡率,尤其是减少冠心病风险,抑制动脉粥样硬化的发展。在本研究中,我们通过在  $LDLR^{-/-}$  小鼠饮水中加入黄酒多酚的提取物,剂量参照成人的摄入水平,发现黄酒多酚具有类似瑞舒伐他汀的作用,不仅可以调节血浆血脂水平,还能够降低 MMP-2、MMP-9 的活性和表达,同时升高 TIMP-1、TIMP-2 的表达,减少了动脉粥样硬化斑块的形成,这可能是黄酒中黄酒多酚心血管保护作用的机制之一。

研究已经发现循环血液中胆固醇和甘油三酯的增高能够增加心血管疾病的风险<sup>[8]</sup>。本研究在高脂喂养的同时,给予瑞舒伐他汀和不同浓度的黄酒多酚干预后,血浆 TC 和 LDLC 较高脂对照组明显下降,说明黄酒多酚有类似于瑞舒伐他汀改善血脂代谢紊乱的作用。动物实验发现酚类物质能够抑制胆固醇的吸收,同时还能抑制胆固醇和/或胆汁酸的肝肠循环,增加粪胆固醇和胆汁酸的排泄,从而降低血浆胆固醇水平<sup>[9]</sup>。此外,在 HepG-2 细胞中<sup>[10]</sup>,发现脱醇红酒等对 LDLR mRNA 的增加呈剂量依赖性,红酒多酚及茶多酚等能明显上调低密度脂蛋白受体的活性和数量。一般而言,当细胞内胆固醇减少会上调 LDLR 表达和活性,而细胞内胆固醇的增加将下调受体<sup>[11]</sup>。已发现多酚能降低肝脏胆固醇浓度。因此肝脏通过反馈调节,上调 LDLR,进一步引起血浆 LDLC 浓度降低。而本研究以  $LDLR^{-/-}$  小鼠为研究对象,其体内 LDLC 通过 LDLR 代谢的途径被阻断,另外的代谢途径主要是以修饰的形式如 ox-LDL 通过巨噬细胞上的 SR 受体和内皮细胞上的 LOX-1 受体介导摄入细胞进入溶酶体分解的。因此黄酒多酚对  $LDLR^{-/-}$  小鼠体内胆固醇代谢的具体作用机制尚需进一步深入研究。

动脉粥样硬化病变的发展特点是过度的血管重塑伴随着细胞和脂质在病变血管内膜层的累积<sup>[12]</sup>。细胞外基质的合成和降解是一个动态的过程,存在血管重塑的整个过程中,它主要是由 MMP 引起的。MMP 能够降解细胞外基质的各种蛋白成分,参与动脉粥样硬化斑块的形成到斑块破裂的全过程<sup>[13]</sup>,其中尤其是 MMP-2 和 MMP-9,其在动脉粥样硬化和狭窄病变处高度表达,降解大部分胶原,对细胞外基质的重塑起重要作用<sup>[14]</sup>。已有研究发现,红酒多酚在体内通过抑制血管紧张素 2 诱导 MMP-2 的表达进而

潜在减轻血管生成<sup>[15]</sup>以及在体外抑制内皮细胞 MMP-9 的表达来保护心血管系统<sup>[16]</sup>。本研究结果也显示不同浓度的黄酒多酚能够不同程度的抑制 MMP-2、MMP-9 的表达,同时在明胶酶谱中可见其活性也是下降的,具有类瑞舒伐他汀的作用。

在正常生理条件下,MMP 的活性受到 TIMP 的调控,TIMP 通过与 MMP 结合形成复合物,从而抑制有活性或无活性的 MMP。TIMP 在维持细胞外基质合成与降解相对平衡中扮演重要角色,MMP/TIMP 比例失衡可导致动脉粥样硬化斑块中基质降解能力增强<sup>[17]</sup>。目前研究表明,TIMP-2 是体内 MMP-2 的特异性抑制物,MMP-9 与 TIMP-1 共同释放,MMP-9 的催化活性受到同时分泌的 TIMP-1 调节<sup>[13]</sup>。研究发现多酚可以增加 TIMP-1 和 TIMP-2 的表达来抑制激活状态下 MMP 的表达。本研究同样发现,黄酒多酚在抑制 MMP-2、MMP-9 表达的同时能够增强 TIMP-1、TIMP-2 的表达。结合主动脉大体标本我们推测,在动脉粥样硬化的发展过程中,在黄酒多酚的干预下,降低了 MMP-2、MMP-9 的表达和活性,促进了 TIMP-1、TIMP-2 的表达,调整了 MMP-2/TIMP-2 和 MMP-9/TIMP-1 之间的平衡,使其平衡倾向了 TIMP 一方,减轻了细胞外基质的重塑,减轻了动脉粥样硬化病变的程度。

饮食是预防心血管疾病的一个基石。在多酚研究中,红酒或茶多酚在体内的研究剂量多介于 20~50 mg/kg,时间多为 1 周至 4 周。本研究采用了 3 种不同浓度的黄酒多酚,干预时间为 16 周,发现它们均能产生有效的血液循环浓度。临床上虽然用他汀来作为预防动脉粥样硬化的一种主要手段,但是鉴于经济收入、药物副作用以及人群依从性等因素,对人群采取他汀类药物口服进行冠心病预防似乎并不现实。黄酒中多酚能够具有类似于瑞舒伐他汀的作用,因此我们可以通过规律和适度的饮用黄酒来经济、便捷且安全有效地实现冠心病的预防。

本研究存在一定的局限性,我们将酚类混合物作为研究对象,而无法确定到底是哪一种单体成分在该实验中起主要作用。另外我们的实验仅从动脉粥样硬化的终末阶段进行研究,而 TIMP 与 MMP 之间是一个动态平衡的关系,未能从动脉粥样硬化的整个过程进行动态研究,有待进一步研究。

#### [参考文献]

[1] Gresele P, Cerletti C, Guglielmini G, et al. Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update[J]. J

Nutr Biochem, 2011, 22 (3): 201-211.

- [2] Leifert WR, Abeywardena MY. Cardioprotective actions of grape polyphenols[J]. Nutr Res, 2008, 28 (11): 729-737.
- [3] 于金召, 王 霄, 何志勇, 等. 不同产地黄酒中营养成分成分的比较分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (32): 15 989-991.
- [4] Guo H, Liu L, Shi Y, et al. Chinese yellow wine and red wine inhibit matrix metalloproteinase-2 and improve atherosclerotic plaque in LDL receptor knockout mice[J]. Cardiovasc Ther, 2010, 28 (3): 161-168.
- [5] Ward S, Lloyd Jones M, Pandor A, et al. A systematic review and economic evaluation of statins for the prevention of coronary events [J]. Health Technol Assess, 2007, 11 (14): 1-160, iii-iv.
- [6] 问海燕, 陈宏斌. 不同剂量阿托伐他汀对急性冠脉综合征患者血清 MMP-2、TIMP-2 水平的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21 (28): 3 544-547.
- [7] Arnaboldi L, Guzzetta M, Pazzucconi F, et al. Serum from hypercholesterolemic patients treated with atorvastatin or simvastatin inhibits cultured human smooth muscle cell proliferation[J]. Pharmacol Res, 2007, 56 (6): 503-508.
- [8] 王先酉, 赵秀华, 王 峰, 等. 高脂饮食引起大鼠动脉血管内皮细胞衰老[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2010, 30 (2): 118-122.
- [9] Agouni A, Lagrue-Lak-Hal AH, Mostefai HA, et al. Red wine polyphenols prevent metabolic and cardiovascular alterations associated with obesity in Zucker fatty rats (Fa/Fa) [J]. PLoS One, 2009, 4 (5): e5557.
- [10] Zern TL, Fernandez ML. Cardioprotective effects of dietary polyphenols[J]. J Nutr, 2011, 135 (10): 2 292-294.
- [11] 陈 芬, 王绿娅, 尹卫东. 低密度脂蛋白受体功能及其影响因素研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (5): 448-450.
- [12] 赵水平. 血脂与动脉粥样硬化及其干预新动向[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (3): 169-171.
- [13] Kampoli AM, Tousoulis D, Papageorgiou N, et al. Matrix metalloproteinases in acute coronary syndromes: current perspectives[J]. Curr Top Med Chem, 2012, 12 (10): 1 192-205.
- [14] 曹健民. 阿托伐他汀联合阿司匹林对不稳定心绞痛患者血清可溶性 CD40 配体、基质金属蛋白酶-2 浓度及心绞痛疗效的影响[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31 (1): 21-24.
- [15] Walter A, Etienne-Selloum N, Sarr M, et al. Angiotensin II induces the vascular expression of VEGF and MMP-2 in vivo: preventive effect of red wine polyphenols[J]. J Vasc Res, 2008, 45 (5): 386-394.
- [16] Scoditti E, Calabriso N, Massaro M, et al. Mediterranean diet polyphenols reduce inflammatory angiogenesis through MMP-9 and COX-2 inhibition in human vascular endothelial cells: a potentially protective mechanism in atherosclerotic vascular disease and cancer [J]. Arch Biochem Biophys, 2012, 527 (2): 81-89.
- [17] Konstantino Y, Nguyen TT, Wolk R, et al. Potential implications of matrix metalloproteinase-9 in assessment and treatment of coronary artery disease[J]. Biomarkers, 2009, 14 (2): 118-129.

(此文编辑 文玉珊)