

红景天甙对间歇性低压低氧诱导的 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的影响

张立平¹, 郑曦², 马双陶¹, 杨大春¹, 李德¹, 王强¹, 张彦¹, 杨永健¹

(1. 成都军区总医院心内科, 四川省成都市 610083; 2. 泸州医学院第一附属医院心内科, 四川省泸州市 646000)

[关键词] 红景天甙; 低压低氧; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 动脉粥样硬化; 斑块稳定性

[摘要] **目的** 观察红景天甙对间歇性低压低氧诱导的载脂蛋白 E 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠动脉粥样硬化的影响及其可能机制。**方法** 30 只 8 周龄健康雄性 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为常压常氧组、间歇性低压低氧组、低压低氧 + 红景天甙组, 其中间歇性低压低氧组和低压低氧 + 红景天甙组被放置在模拟海拔 5000 m 低压低氧舱内每天 8 h, 每组给予相同的普通饮食喂养, 低压低氧 + 红景天甙组灌服红景天甙 30 mg/(kg · d), 而常压常氧组和间歇性低压低氧组灌服等量蒸馏水, 连续灌胃 12 周后取小鼠血样测空腹血糖和血脂, 取小鼠主动脉根部, HE 染色观察动脉粥样硬化斑块的大小, Masson 染色观察斑块内胶原含量, Western blot 检测基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 (TIMP-2) 蛋白的表达。**结果** 三组空腹血糖和血脂水平无统计学差异 ($P > 0.05$); 与常压常氧组比较, 间歇性低压低氧组动脉粥样硬化斑块面积明显增加 ($P < 0.01$), 胶原含量明显减少 ($P < 0.01$); 与间歇性低压低氧组比较, 低压低氧 + 红景天甙组斑块面积、MMP-2 和 MMP-9 蛋白水平明显降低 ($P < 0.01$), 而斑块内胶原含量、TIMP-2 蛋白水平明显增加 ($P < 0.01$)。**结论** 红景天甙能抑制间歇性低压低氧诱导的动脉粥样硬化斑块形成, 并提高斑块的稳定性, 其机制可能与红景天甙增加斑块内胶原含量有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Salidroside on Atherosclerosis of ApoE^{-/-} Mice with Intermittent Hypobaric Hypoxia

ZHANG Li-Ping¹, ZHENG Xi², MA Shuang-Tao¹, YANG Da-Chun¹, LI De¹, WANG Qiang¹, ZHANG Yan¹, and YANG Yong-Jian¹

(1. Department of Cardiology, Chengdu Army General Hospital, Chengdu, Sichuan 610083, China; 2. Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[KEY WORDS] Salidroside; Hypobaric Hypoxia; Apolipoprotein E Gene Knockout Mice; Atherosclerosis; Plaque Stability

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of salidroside on atherosclerosis of apolipoprotein E gene knockout mice (ApoE^{-/-}) with intermittent hypobaric hypoxia, so as to illuminate the role of salidroside on atherogenesis. **Methods** Thirty eight-week-old male ApoE^{-/-} mice were randomized into normobaric normoxic group (control group), intermittent hypobaric hypoxia group (IHH), hypobaric hypoxia + salidroside group (intervention group) for 12 weeks. Mice in IHH group and intervention group were exposed to a hypobaric chamber mimicking the hypobaric hypoxia condition on an altitude of 5000 m for 8 hours every day, each group was fed with the same general diet, the intervention group was given salidroside 30 mg/(kg · d), oral gavage, while the control group and IHH group were administered distilled water. Then fasting blood glucose (FBG) and plasma lipid levels were measured, paraffin sections of mice aorta roots were made. The aorta atherosclerotic lesion area and plaque collagen content were measured by HE staining and Masson staining. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) protein expression were analyzed

[收稿日期] 2014-01-07

[基金项目] 中国人民解放军成都军区总医院科研课题 (2011YG-B32)

[作者简介] 张立平, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事动脉粥样硬化的基础和临床研究, E-mail 为 zhangliping1020@126.com。通讯作者杨永健, 博士后, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事动脉粥样硬化的基础和临床研究, E-mail 为 yongjian@yahoo.com。

by Western blot. **Results** The three groups did not statistically differ in FBG and plasma lipid levels ($P > 0.05$). Compared with control group, atherosclerotic plaque area were increased significantly ($P < 0.01$), whereas plaque collagen content were increased in IHH group ($P < 0.01$). Compared with IHH group, plaque area and the protein expression of MMP-2 and MMP-9 were decreased significantly ($P < 0.01$), whereas plaque collagen content and the protein expression of TIMP-2 were increased in salidroside intervention group ($P < 0.01$). **Conclusion** Salidroside attenuates atherosclerosis and enhances plaque stability in ApoE^{-/-} mice of IHH. The mechanism is in connection with salidroside increased plaque collagen content.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是导致心脑血管病患病及死亡的主要因素之一。环境因素可以增加心血管疾病的发生率,大量研究表明高海拔与增加的心血管疾病风险相关。研究表明慢性间歇性低氧可导致 As,加速斑块进展^[1,2]。而胶原对 As 斑块稳定性有着重要作用。我们前期研究发现间歇性低压低氧能够促进载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E gene knockout, ApoE^{-/-}) 小鼠 As 斑块的不稳定性^[3]。红景天甙作为一种有效的药用植物,它能够保护心脏、保护神经、抗疲劳、抗压力、抗肿瘤等^[4,5],红景天甙对间歇性低压低氧诱导的 As 的影响如何?对斑块胶原是否有作用?目前尚未见报道,为此本研究选择 ApoE^{-/-} 小鼠作为实验动物,观察红景天甙对间歇性低压低氧诱导的 ApoE^{-/-} 小鼠 As 的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物、试剂与仪器

30 只 8 周龄遗传背景为 C57 BL/6J 的 ApoE^{-/-} 小鼠,雄性,体重 20 ± 2 g,购于南京大学动物实验中心。FLYDWC50-1A 型低压低氧动物实验舱(贵州风雷航空军械有限责任公司);红景天甙由西安源森生物科技有限公司提供,纯度 $>99\%$;基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2) 抗体(博士德公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒和超敏 ECL 化学发光试剂盒(碧云天公司);石蜡包埋机及切片机(Thermo Scientific, 英国);全自动生化分析仪及 Olympus BX41 显微镜(Olympus, 日本);Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析系统为美国 Media Cybernetics 公司产品。

1.2 动物模型的建立及干预

将 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为常压常氧组、间歇性低压低氧组、低压低氧 + 红景天甙组,每组 10 只,均安置在同一实验室内,其中间歇性低压低氧组和低

压低氧 + 红景天甙组被放置在模拟海拔 5000 m 低压低氧舱内每天 8 h,每组给予相同的普通饮食喂养,低压低氧 + 红景天甙组灌服红景天甙 $30 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$,而常压常氧组和间歇性低压低氧组灌服等量蒸馏水,连续灌胃 12 周。

1.3 血液及组织标本的采集

实验期满后,各组 ApoE^{-/-} 小鼠于空腹 12 h 后乙醚麻醉,眼眶取血, $3000 \text{ r}/\text{min}$ 离心 25 min,分离血清,全自动生化分析仪测定空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平。处死各组动物,立即分离主动脉,从主动脉根部至腹主动脉,并取出保留主动脉根部的心脏,将主动脉置于 -80°C 保存用于 Western blot 检测。将保留主动脉根部的心脏立即用 4% 多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,从每只小鼠主动脉根部 3 个瓣膜均出现处开始取,间断均匀切片,切片厚度均为 $5 \mu\text{m}$,分别行 HE 染色和 Masson 染色。

1.4 图像分析系统检测主动脉粥样硬化斑块面积和胶原含量

主动脉根部石蜡切片 HE 染色及 Masson 染色后,利用 Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件系统计算主动脉粥样硬化斑块面积及进行胶原含量定量分析,同时记录管腔面积,胶原含量为血管斑块 Masson 染色胶原含量面积占血管斑块面积的百分比。

1.5 Western blot 分析 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 蛋白的表达

在标本中加入液氮,研磨后按 1 mg 组织加入预冷的 $10 \mu\text{L}$ 裂解液(含终浓度为 $1 \text{ mol}/\text{L}$ 的 PMSF)裂解组织,收集裂解组织于 4°C 下、 $1200 \text{ r}/\text{min}$ 离心 5 min,使用 BCA 定量试剂盒检测蛋白浓度。常规电泳、转膜、封闭后结合相应的 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 抗体,内参 β -actin, 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜,结合相应的辣根过氧化物酶标记的二抗。用 ECL 化学发光

试剂盒与 PVDF 膜共孵育 1 min 后,将 PVDF 膜与 X 光片放入暗盒内曝光 3 min,显影后再定影。扫描胶片,用软件分析条带光密度值,以 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 与 β -actin 条带的吸光面积积分比值评定 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 蛋白表达水平。

1.6 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检

表 1. ApoE^{-/-} 小鼠空腹血糖和血脂水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, mmol/L)

Table 1. FBG and lipid levels in ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, mmol/L)

分 组	FBG	TC	TG	LDLC	HDLC
常压常氧组	5.59 ± 1.25	9.32 ± 1.38	1.06 ± 0.27	1.41 ± 0.23	0.45 ± 0.15
间歇性低压低氧组	5.83 ± 1.45	10.12 ± 0.96	1.03 ± 0.34	1.56 ± 0.27	0.41 ± 0.07
低压低氧 + 红景天甙组	5.73 ± 1.15	9.76 ± 1.46	1.02 ± 0.19	1.52 ± 0.34	0.52 ± 0.16

2.2 红景天甙对主动脉粥样硬化斑块面积的影响

HE 染色显示,三组 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉根部均可见斑块形成,但间歇性低压低氧组主动脉根部斑块面积较常压常氧组明显增加 (29.56% ±

验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 红景天甙对血糖、血脂水平的影响

常压常氧组、间歇性低压低氧组与低压低氧 + 红景天甙组 ApoE^{-/-} 小鼠 FBG、TC、TG、LDLC 及 HDLC 水平无统计学差异 (表 1)。

2.26% 比 19.95% ± 2.96%, $P < 0.01$), 低压低氧 + 红景天甙组主动脉根部斑块面积较间歇性低氧低氧组明显减少 (14.97% ± 1.76% 比 29.56% ± 2.26%, $P < 0.01$; 图 1 和 2)。

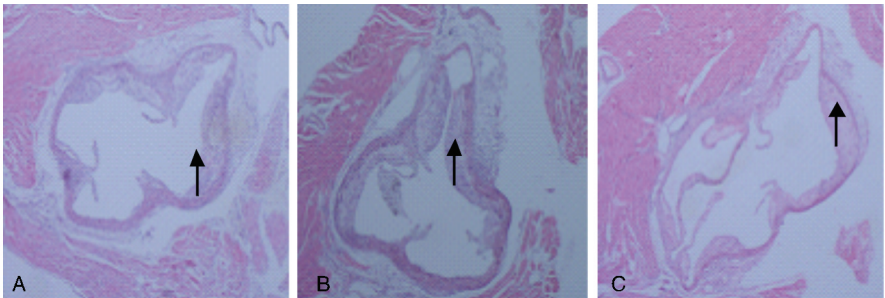


图 1. ApoE^{-/-} 小鼠主动脉根部斑块粥样硬化程度 (×40) A 为常压常氧组,B 为间歇性低压低氧组,C 为低压低氧 + 红景天甙组。

Figure 1. Aortic roots atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice (×40)

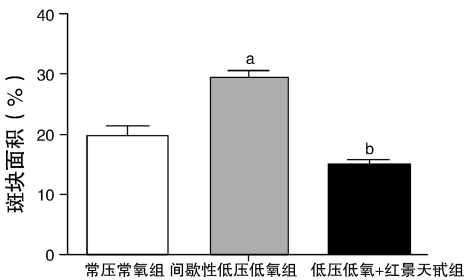


图 2. ApoE^{-/-} 小鼠主动脉根部斑块面积 a 为 $P < 0.01$, 与常压常氧组比较;b 为 $P < 0.01$, 与间歇性低压低氧组比较。

Figure 2. Atherosclerotic plaque areas in ApoE^{-/-} mice

2.3 红景天甙对斑块内胶原含量的影响

间歇性低压低氧组斑块内胶原含量较常压常氧组明显降低 (18.75% ± 2.58% 比 37.52% ± 4.35%, $P < 0.01$), 而低压低氧 + 红景天甙组斑块

内胶原含量较间歇性低压低氧组明显升高 (31.13% ± 9.7% 比 18.75% ± 2.58%, $P < 0.01$), 间歇性低压低氧组和低压低氧 + 红景天甙组血管非斑块部分改变不明显 (图 3 和 4)。

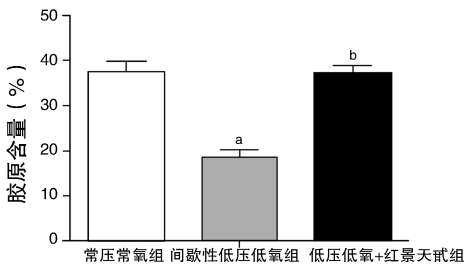


图 3. ApoE^{-/-} 小鼠主动脉根部斑块内胶原含量 a 为 $P < 0.01$, 与常压常氧组比较;b 为 $P < 0.01$, 与间歇性低压低氧组比较。

Figure 3. Collagen content of aortic roots atherosclerotic lesions in ApoE^{-/-} mice

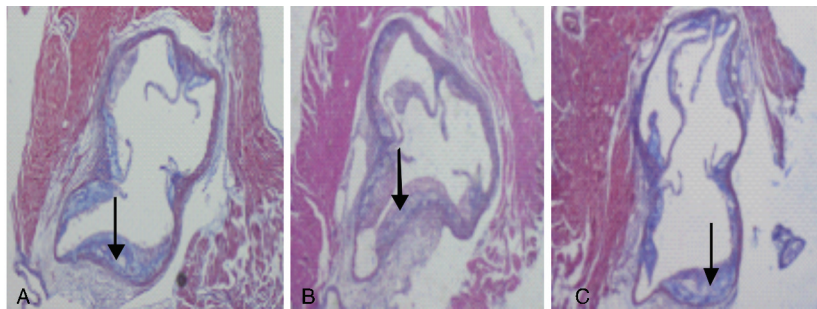


图 4. Masson 染色 (×40) A 为常压常氧组,B 为间歇性低压低氧组,C 为低压低氧 + 红景天组。
Figure 4. Masson staining (×40)

2.4 斑块内 MMP-2、MMP-9、TIMP-2 蛋白的表达

与常压常氧组比较,间歇性低压低氧组 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达显著增加,TIMP-2 蛋白表达明

显降低 ($P < 0.05$);与间歇性低压低氧组比较,低压低氧 + 红景天组 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达显著降低,TIMP-2 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$;图 5)。

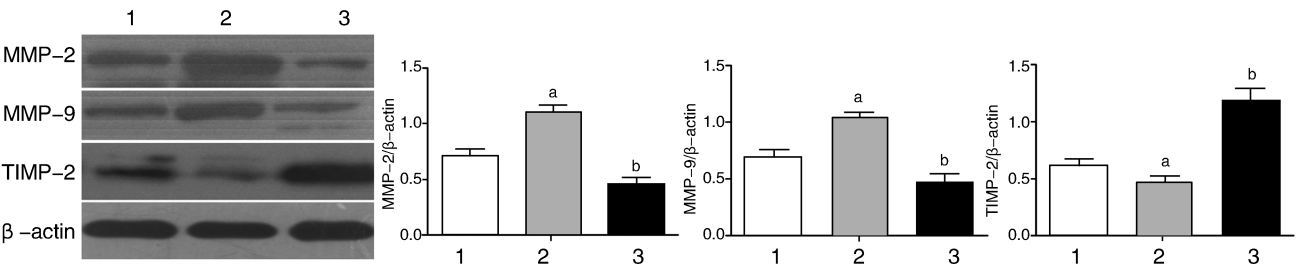


图 5. Western blot 检测主动脉斑块内 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-2 的蛋白表达 1 为常压常氧组,2 为间歇性低压低氧组,3 为低压低氧 + 红景天组。a 为 $P < 0.05$,与常压常氧组比较;b 为 $P < 0.01$,与间歇性低压低氧组比较。
Figure 5. Protein expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 in aortic roots atherosclerotic lesions by Western blot

3 讨论

高原地区是我国特有的气候和地理环境,是高原地区人民及部队不可避免的生活、驻防和作战环境,并且现在赴高原旅游的人也越来越多。高原环境可引起高原性心脏病、As 等心血管疾病,严重威胁当地人民、旅游人员及官兵的生命健康,也极大地影响人民生活及部队的作战能力,探索高原性心脏损害及 As 的发病机制和防治策略有着重要意义。

ApoE^{-/-}小鼠是目前常用的 As 模型,能够在自然膳食条件下自发形成 As,且其病理特征与人 As 非常相似,是研究 As 发生机制的优良动物模型^[6]。红景天作为红景天属最重要的生物活性成分之一已被广泛用于传统的中医药当中^[7]。我们的研究发现红景天可以明显改善低压低氧诱导的 As 斑块的进展,并增加斑块中胶原的含量提高其稳定性。以上发现表明红景天对间歇性低压低氧诱导的 As 有治疗作用。动脉粥样斑块由脂质核心和纤维帽形成。斑块的稳定与否主要取决于脂质核心面积的大小和纤维帽厚度。研究发现具

有较大脂质核心的斑块容易发生破裂,如果脂质核心面积超过斑块总面积的 40%,那么该斑块具有显著的不稳定性^[8],As 中稳定斑块向不稳定转变与心血管疾病事件密切相关,斑块稳定性成为现代心血管疾病防治研究的热点。本研究中,低压低氧增加了 As 斑块的面积,而红景天减轻了低压低氧导致的 ApoE^{-/-}小鼠主动脉粥样硬化斑块的进展,但却对血糖及血脂水平无影响,表明红景天降低低压低氧介导的 ApoE^{-/-}小鼠 As 程度的作用独立于血脂水平的改变。这与仲英洁等^[9]用高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠致血脂升高情况不一样,但此研究对于血脂水平的改变与钟兴明等^[10]研究基本相似。

在急性冠状动脉综合症患者中,斑块胶原的含量在阻止斑块破裂方面具有重要的作用并且可以减少 As 斑块的不稳定性^[11]。本研究发现间歇性低压低氧组胶原含量较常压常氧组要低,而低压低氧 + 红景天组胶原含量比间歇性低压低氧组高,间歇性低压低氧组和低压低氧 + 红景天组对血管非斑块部分影响不明显,表明低压低氧 + 红景天组可以增加动脉斑块稳定性,这可能与抑制 MMP-2

和 MMP-9 的上调,升高 TIMP-2 的表达有关。基质金属蛋白酶家族表达在平滑肌细胞、巨噬细胞中,具有降解细胞外基质的作用,通过影响脂质核心及降解纤维帽来改变粥样斑块的稳定性,参与 As 斑块去稳定性作用,并通过降解粥样斑块纤维帽促进斑块破裂^[12]。MMP-2 对细胞外基质的降解作用被认为是治疗 As 和防治并发症的靶分子^[13]。Peterson 等^[14]研究发现 MMP-9 的过表达可使细胞外基质降解活性增强,从而降解斑块强度,促使斑块破裂。TIMP-2 为基质金属蛋白酶的内源性抑制因子,可特异性地抑制 MMP-2 和 MMP-9 的产生,使 MMP/TIMP 维持动态平衡,MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达升高,TIMP-2 蛋白表达降低预示着斑块的不稳定或破裂。本研究结果表明,红景天甙通过抑制 MMP-2 和 MMP-9,升高 TIMP-2 而具有抑制 As 斑块进展和增加其稳定性的作用。

综上,我们认为间歇性低压低氧可以促进 As 的进展,导致斑块的不稳定性,但红景天甙能够削弱间歇性低压低氧促进 As 斑块进展的作用,并增加斑块的稳定性,其机制可能与红景天甙调节斑块内胶原含量及 TIMP-2 蛋白表达增加,与 MMP-2、MMP-9 蛋白表达减少有关。因此,红景天甙可能在防治高原环境导致的 As 有一定的运用前景,但由于低压低氧诱导的 As 斑块的形成和进展是一个多因素相互作用的复杂过程,在此过程中,各因素间是否发挥了协同作用以及是否还有其它因素参与并发挥了调控作用,尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Jun J, Reinke C, Bedja D, et al. Effect of intermittent hypoxia on atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 20 (9): 381-386.
- [2] Savransky V, Nanayakkara A, Li J, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007, 17 (5): 1 290-297.
- [3] Jiang SH, Jin FP, Li D, et al. Intermittent hypobaric hypoxia promotes atherosclerotic plaque instability in ApoE-deficient mice[J]. *High Alt Med Biol*, 2013, 14 (2): 175-180.
- [4] Panossian A, Wilkman G, Sarris J. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy[J]. *Phytomedicine*, 2010, 17 (6): 481-493.
- [5] Zubeldia JM, Nabi HA, Jimenez del Rio M, et al. Exploring new applications for *Rhodiola rosea*: can we improve the quality of life of patients with short term hypothyroidism induced by hormone withdrawal[J]? *Med Food*, 2010, 13 (4): 1 287-292.
- [6] Jwien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis[J]. *Physiol Pharmacol*, 2004, 55 (3): 503-517.
- [7] Ma C, Tang J, Wang H, et al. Preparative purification of salidroside from *Rhodiola rosea* by two-step adsorption chromatography on resins[J]. *J Sep Sci*, 2009, 32 (2): 185-191.
- [8] Wasserman BA, Sharrett AR, Lai S, et al. Risk factor associations with the presence of a lipid core in carotid plaque of asymptomatic individuals using high-resolution MRI: the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) [J]. *Stroke*, 2008, 39 (2): 329-335.
- [9] 仲英洁, 张子为, 徐 郁, 等. 阿托伐他汀对 ApoE^{-/-}小鼠主动脉粥样硬化和钙化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21 (4): 305-310.
- [10] 钟兴明, 何 榕, 尤少华, 等. 有氧运动对高同型半胱氨酸血症载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (9): 782-786.
- [11] Neumeister V, Scheibe M, Lattke P, et al. Determination of the cholesterol-collagen ratio of arterial atherosclerotic plaques using near infrared spectroscopy as a possible measure of plaque stability [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 165 (4): 251-257.
- [12] Koenig W, Khuseynova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27 (1): 15-26.
- [13] Liu D, Ge S, Zhou G, et al. Montelukast inhibits matrix metalloproteinases expression in atherosclerotic rabbits [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2009, 23 (6): 431-437.
- [14] Peterson M, Porter KE, Loftus IM, et al. Marimastat inhibits neointimal thickening in a model of human arterial intimal hyperplasia[J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2000, 19 (4): 461-467.

(此文编辑 文玉珊)