

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2013.02.007

青心酮对兔动脉粥样硬化血管细胞黏附因子-1 蛋白表达的影响

王琳 刘同美[△] 张代娟 刘江月
(潍坊医学院病理生理教研室, 山东 潍坊 261053)

摘要 目的 探讨新西兰大白兔动脉粥样硬化病变中血管细胞黏附因子-1(VCAM-1)的表达和青心酮抗动脉粥样硬化作用。**方法** 18只新西兰大白兔随机分为常规饲料组、胆固醇饲料组和青心酮组,饲养12周。实验前后检测血清胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL),采用免疫组化和Western blot法测定主动脉VCAM-1阳性表达百分比和蛋白的表达。**结果** 青心酮显著降低TC、TG和LDL水平($P < 0.05$)。胆固醇组和青心酮组病变局部VCAM-1的阳性细胞百分比和蛋白的表达含量明显高于常规饲料组($P < 0.05$)。但青心酮组动脉粥样硬化改变较胆固醇组明显减轻,VCAM-1阳性百分比和蛋白的表达量较胆固醇饲料组明显降低($P < 0.05$)。**结论** 动脉粥样硬化的发生伴有血管细胞黏附因子的高度表达,青心酮不但有调脂作用,且具有抑制黏附分子表达和抗动脉粥样硬化的作用。

关键词 青心酮;血管细胞黏附因子-1;动脉粥样硬化

中图分类号:R363 **文献标志码**:A **文章编号**:1000-9760(2013)04-100-04

The effect of DHAP on the expression of VCAM-1 in atherosclerotic rabbits

WANG Lin, LIU Tongmei, ZHANG Daijuan, et al

(Department Pathophysiology of Weifang Medical College, Weifang 261053, China)

Abstract: Objective To explore the effect of DHAP on the expression of VCAM-1 in atherosclerotic rabbits. **Methods** 18 rabbits were randomly divided into three groups: normal group, cholesterol diet group, DHAP treatment group. All rabbits were fed for 12 weeks. Serum TC, TG, LDL were measured in 0 and 12 weeks in three groups. At 12 week, we detected the aortic VCAM-1 positive percentage by immunohistochemistry assay and the expression of VCAM-1 protein by Western blot. **Results** DHAP can obviously decrease the level of TC TG and LDL ($P < 0.05$). The measurement of VCAM-1 positive percentage and the expression of VCAM-1 protein both in cholesterol diet group and DHAP treatment group were higher than normal group ($P < 0.05$), but pathologic changes in DHAP treatment group were lower than cholesterol group ($P < 0.05$). The measurement of VCAM-1 positive percentage and the expression of VCAM-1 protein were also lower than cholesterol diet group ($P < 0.05$). **Conclusion** VCAM-1 can be highly expressed in atherosclerosis. DHAP can not only decrease cholesterol but also inhibit expression of VCAM-1 which has the effect of anti-atherosclerosis.

Key words: 3,4-dihydroxyacetophenone; Vascular cell adhesion molecule-1; Atherosclerosis

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种多因素相互作用引起的一类血管慢性炎症性疾病^[1],其形成过程和发病机制至今尚未被完全阐明。活血化瘀中药成分青心酮(3,4-dihydroxy-acetophenone, 3,4-DHAP)在临床用于冠心病、妊娠征均获得较好的临床效果^[2-3]。本实验旨在研究DHAP对AS病变中VCAM-1表达的影响,探讨DHAP对AS的防治机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

18只新西兰大白兔,♂, (体重2.0~2.5kg, 12周龄),常规饲料适应性喂养1周后,随机分为3组:常规饲料组、胆固醇饲料组和DHAP组,每组6只。胆固醇饲料组给予高脂饮食(配方为:83.5%常规饲料,8%猪大油,7.5%蛋黄粉,1%胆固醇),青心酮组除高脂饮食外,给予DHAP(10mg/kg),常规饲料组做对照组。喂养至12周末处死。

[△] [通信作者]刘同美, E-mail: tongmeiliu@126.com

1.2 血脂检测和体重测量

0 周和 12 周末耳缘静脉取血,离心后取血清,应用全自动生化分析仪测定 TC、TG、LDL。抽血前测量体重。

1.3 组织形态学观察

12 周末处死动物,迅速分离出主动脉,选取主动脉约 1.5cm,10%中性福尔马林溶液固定 24h,梯度乙醇脱水,石蜡包埋,切片机上制成 5 μ m 厚的连续切片,每组 50 张,每间隔 6 张取 1 张,行 HE 染色,光镜下观察组织学形态。

1.4 免疫组织化学分析

采用 ABC 法进行组织染色,一抗采用抗兔 VCAM-1 多克隆抗体(购于武汉博士德生物科技有限公司)。DAB 显色,苏木素复染,封片后在显微镜下观察。应用 Motic Images Advenced 3.2 图像分析软件计算阳性细胞百分比,求平均值。

1.5 Western blot 法检测 VCAM-1 蛋白表达

取主动脉约 1cm 加入裂解液,冰浴状态下提取蛋白,12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,转膜,5%脱脂奶粉封闭 60min,一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 冲洗 5min,共 3 次,碱性磷酸酶标记二抗 37 $^{\circ}$ C 60min, TBST 冲洗 3 次,每次 5min, ECL 法显色,图像分析。

1.6 统计学方法

全部数据用 SPSS 统计软件进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。自身比较采用配对 t 检验,组间比较采用两独立样本 t 检验。显著性水平 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂及体重变化

实验前各组血清 TC、TG、LDL、体重均无明显差异($P > 0.05$);12 周后 3 组动物体重明显增加,但组间无统计学差异($P > 0.05$);12 周后常规饲料组 TC、TG、LDL 无明显变化($P > 0.05$),胆固醇饲料组和 DHAP 组血清 TC、TG、LDL 较 12 周前明显升高(t 值分别为 9.02、4.609、13.267, $P < 0.05$),TG 较 12 周前无明显变化($P > 0.05$),DHAP 组 TC、TG、LDL 较胆固醇饲料组明显下降(t 值分别为 6.004、19.007、28.004, $P < 0.05$)。结果见表 1。

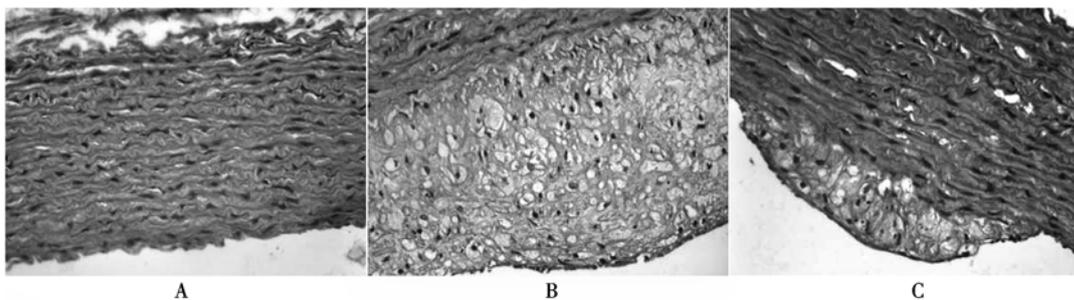
2.2 组织形态学改变

光镜下见胆固醇饲料组内膜增厚多处形成较大斑块,可见较多泡沫细胞。DHAP 组内膜也增厚,但较胆固醇组明显减轻。常规组无上述表现。结果见图 1。

表 1 实验前后各组动物血脂水平($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	实验前			实验后		
	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL(mmol/L)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL(mmol/L)
常规饲料组	1.02 \pm 0.12	0.69 \pm 0.05	0.54 \pm 0.03	1.01 \pm 0.13	0.66 \pm 0.09	0.53 \pm 0.03
胆固醇饲料组	1.03 \pm 0.11	0.66 \pm 0.08	0.53 \pm 0.05	42.66 \pm 6.39*	0.87 \pm 0.05*	7.39 \pm 0.08*
DHAP 组	1.00 \pm 0.11	0.63 \pm 0.05	0.55 \pm 0.03	22.20 \pm 5.36* Δ	0.41 \pm 0.038* Δ	4.69 \pm 0.21* Δ

注:与实验前血脂比较,*表示 $P < 0.05$;试验后胆固醇组与 DHAP 组血脂比较, Δ 表示 $P < 0.05$



A:常规饲料组;B:胆固醇饲料组;C:DHAP 组

图 1 各组动物主动脉横断面 HE 染色病理切片(400 \times)

2.3 免疫组织化学分析

胆固醇饲料组、DHAP 组内膜和中膜 VCAM-1 阳性细胞含量明显高于常规饲料组 (t 值分别为 11.724、8.665, $P < 0.05$), DHAP 组与胆固醇饲料组相比阳性细胞含量明显下降 ($t = 3.830$, $P < 0.05$)。结果见表 2。

表 2 各组动物主动脉壁 VCAM-1 阳性细胞百分比 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	VCAM-1
常规饲料组	3.54 ± 0.55
高脂饲料组	30.14 ± 5.53*
DHAP 组	19.12 ± 4.37*△

注:高脂饲料组、DHAP 组与常规饲料组比较,*表示 $P < 0.05$;DHAP 组与高脂饲料组比较,△表示 $P < 0.05$

2.4 主动脉 VCAM-1 蛋白表达

与常规饲料组相比,胆固醇饲料组 VCAM-1、DHAP 组表达明显增多 (t 值分别为 20.068、3.652, $P < 0.05$)。DHAP 组与胆固醇饲料组相比 VCAM-1 表达明显减少 ($t = 14.697$, $P < 0.05$)。结果见表 3、图 2。

表 3 各组动物主动脉壁 VCAM-1 蛋白表达量分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	VCAM-1
常规饲料组	0.09 ± 0.03
高脂饲料组	0.79 ± 0.08*
DHAP 组	0.19 ± 0.06*△

注:高脂饲料组、DHAP 组与常规饲料组比较,*表示 $P < 0.05$;DHAP 组与高脂饲料组比较,△表示 $P < 0.05$



A:常规饲料组;B:胆固醇饲料组;C:DHAP 组

图 2 DHAP 对各组主动脉 VCAM-1 蛋白表达影响

3 讨论

血管细胞黏附因子-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) 在内皮细胞、平滑肌细胞及白细胞仅有少量表达,是一种介导细胞间、细胞与胞外基质间黏附与相互作用的膜表面蛋白。90 年代初有人发现在兔 AS 模型平滑肌中 VCAM-1 表达含量较高^[4],随后大量动物实验都发现在 AS 病

变区域的粥样斑块中有 VCAM-1 的大量表达。90 年代,Hackman 在对大量血脂紊乱患者 VCAM-1 水平测定过程中发现,VCAM-1 在胆固醇增高和甘油三酯增高的患者中增加尤为明显^[5]。以上这些证据统统表明,VCAM-1 在 AS 发生发展过程中扮演着重要的角色。

AS 是一种慢性炎症疾病,内皮细胞受损以及单核细胞与内皮细胞的黏附是 AS 形成的关键。单核细胞在黏附分子作用下停靠在血管壁,在趋化因子促进下进入内皮细胞转化为巨噬细胞。血脂紊乱、高血压等都可作为损伤因子损伤血管内皮,导致 LDL 渗入并积聚于内皮下氧化为 ox-LDL,其中某些脂类与细胞受体结合后激活基因表达,促使内皮细胞表达大量黏附分子,使血流中的单核细胞、T 淋巴细胞黏附于受损内皮表面,单核细胞在单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 作用下迁移入内皮下,摄取 ox-LDL 转化为激活的巨噬细胞,成为泡沫细胞^[6]。通过抑制 VCAM-1 来阻止单核细胞与内皮黏附有望成为 AS 预防的新靶点。

DHAP,又名 3,4-二羟基苯丙酮,是具有活血化瘀作用中药秃毛冬青叶的有效成分,在临床用于冠心病、妊高征均获得了较好的临床效果,大量中药药理学研究显示,DHAP 对扩张血管,抑制血管平滑肌增殖等也有较好的效果^[2]。DHAP 还可通过抑制炎症因子如 TNF- α 、COX-2 发挥抗炎作用。

本试验通过高胆固醇血症建立了兔 AS 模型,经过 12 周的高脂饲料喂养后,各组兔均出现了不同程度的高脂血症。通过对各组主动脉壁 HE 染色观察发现高脂饲料组与 DHAP 组均出现了大小不同的斑块,证明本次试验成功复制出 AS 模型。本次研究发现 DHAP 对 AS 中斑块大小、血脂水平以及 VCAM-1 含量均有很大影响,本文结果显示 DHAP 对兔的血脂有抑制作用,DHAP 组中的 TC、TG、LDL 水平较高脂饲料组明显下降,且具有统计学意义 ($P < 0.05$)。大量循证医学都表明 AS 严重程度随血脂水平升高呈线性加重。本文结果也显示 DHAP 显著降低了 AS 病变区域 VCAM-1 表达,大量研究表明,VCAM-1 的表达与 AS 严重程度呈正相关,即随着 AS 斑块的增大其表达越多,通过本次研究使得 VCAM-1 与 AS 严重程度的研究更加具有说服力^[7]。本实验表明 DHAP 可抑制兔 AS 模型 VCAM-1 过度表达,并使粥样斑块缩小,表明 VCAM-1 参与了 AS 的形成过程。DHAP 除具有降脂作用 (下转第 105 页)

积导体的量,在体时则为心脏周围组织液的量能够影响 R 波的大小。当心脏周围的某些病变如胸腔积液、心包炎致心包积液等,若改变了心脏周围的组织液的量或质时可能出现 R 波的改变。

参考文献:

[1] 朱大年. 生理学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:86-98.

[2] 黎萌. 电偶极子与模拟心电图测量[J]. 大学物理,1994,13(8):29-30.
 [3] 周翔. 心脏周围组织内心电场传播的衰减[J]. 第一军医大学学报,2001,21(9):653-654.
 [4] Stinstra JG. The volume conductor may act as a temporal filter on the ECG and EEG[J]. Med Biol Eng Comput,1998,36(6):711-716.

(收稿日期 2013-01-15)

(上接第 99 页)

本次实验所用的是乙醇萃取剂,而乙醇本身的抑菌作用不能忽视,尤其是本次实验药物稀释前后抑菌环直径不是成比例的缩小,在一定程度上体现出了乙醇是本次实验的一个重要影响因素。但乙醇易挥发,作用不稳定,所以在一般的实验中很少涉及关于乙醇的空白实验。近年来中药提取物对细菌的抑制作用研究较多,而中药抑菌作用的研究也是开发利用中药资源的一个重要组成部分。本实验只是对金银花和野菊花进行了粗提,因此,不能确定到底是哪种具体成分具有抑菌作用。下一阶段的研究任务是采用不同的分离方法分离金银花和野菊花的具体成分,以便确定到底是哪种成分具有抑菌作用。

参考文献:

[1] 任爱农,王志刚,卢振初,等. 金银花抑菌和抗病毒作用实验研究[J]. 药物生物技术,1999,6(4):241.
 [2] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2006:2144.
 [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2005 年版[M]. 一部. 北京:化学工业出版社,2005:596.
 [4] 消毒产品检验消毒技术规范[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2002:83-93.
 [5] 管仲莹,赵金明,林巧智. 金银花提取物抑菌作用的实验研究[J]. 辽宁省中医药研究院,2009,47(15):150-152.
 [6] 张清华,张玲. 菊花化学成分及药理作用的研究进展[J]. 食品与药品,2007,2:60-63.
 [7] 曾帅,王子寿,贾俊. 野菊花水煎液体外抗菌作用实验研究[J]. 中国中医急症,2008,7(17):971.
 [8] 高静,龙伟. 中药提取技术的研究进展[J]. 医学导报,2007,26(9):1058-1060.

(收稿日期 2013-02-04)

(上接第 102 页)

此外,还具有抑制 VCAM-1 的表达,可能是其抗 AS 的机制之一。然而这些有益的影响的确切机制尚不清楚,还需进一步的研究。

参考文献:

[1] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. N Engl J Med,1999,340(2):115-126.
 [2] 吴萍,黄引平,叶笃筠,等. 青心酮活血化痰作用机制的研究进展[J]. 中草药,2001,32(3):277-279.
 [3] 黄引平,叶笃筠,马庭元,等. 青心酮对妊高征患者胎盘血管壁一氧化氮合成酶和血浆内皮素的影响[J]. 中华妇产科杂志,1996,31(11):667-669.

[4] Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, et al. Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma[J]. Am J Pathol,1993,143(6):1551-1559.
 [5] Hackman A, Abe Y, Insull W Jr, et al. Levels of soluble adhesion in patients with dyslipidemia[J]. Circulation,1996,93(7):1334-1338.
 [6] 冯宗忱. 动脉粥样硬化-血管壁的慢性炎症[J]. 中华心血管病杂志,2005,33(5):393-394.
 [7] Larsson PT, Hallerstrom S, Rosfors S, et al. Circulating markers of inflammation are related to carotid artery atherosclerosis[J]. Int Angiol,2005,24(1):43-51.

(收稿日期 2013-02-11)