

醋柳黄酮对高同型半胱氨酸致兔动脉粥样硬化的抑制作用研究[△]

王晨晨^{1*}, 王华亭^{1#}, 陈立光², 王红艺³, 李莉¹, 刁丽霞¹, 王尊哲⁴, 苏国海¹, 张维东⁵(1. 山东大学附属济南市中心医院心内科, 济南 250013; 2. 山东省医学影像学研究所, 济南 250021; 3. 山东省千佛山医院, 济南 250014; 4. 内蒙古科技大学包头医学院第二附属医院心内科, 内蒙古包头 014030; 5. 山东省医学科学院基础医学研究所, 济南 250062)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)41-3866-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.41.09

摘要 目的: 研究醋柳黄酮对高同型半胱氨酸(Hcy)致兔动脉粥样硬化(AS)的作用机制。方法: 以球囊牵拉法损伤兔腹主动脉联合0.5%高蛋氨酸饲料喂养建立高Hcy血症致AS模型。将48只兔随机均分为空白对照组(生理氯化钠溶液)、模型组(生理氯化钠溶液)、阳性对照组(叶酸0.58 mg/kg、维生素B₆ 1.15 mg/kg、维生素B₁₂ 28.75 μg/kg)和醋柳黄酮低、中、高剂量组(0.32、0.76、1.6 g/kg), 每日灌胃给予相应药物1次, 持续8周。末次给药后检测各组兔血浆中Hcy浓度, 对腹主动脉进行苏木素-伊红(HE)染色观察AS的病理变化, 用免疫组织化学测定腹主动脉中核因子-κB(NF-κB)及单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)的表达。结果: 与空白对照组比较, 模型组兔血浆中Hcy浓度和腹主动脉中NF-κB、MCP-1表达均明显升高($P < 0.01$), 血管内膜明显增厚, 平滑肌细胞排列紊乱; 与模型组比较, 醋柳黄酮各剂量组和阳性对照组兔血浆中Hcy浓度和腹主动脉中NF-κB、MCP-1表达均明显降低($P < 0.01$), 其中醋柳黄酮高剂量组较阳性对照组降低更明显($P < 0.01$); 血管内膜增厚明显减轻, 且与醋柳黄酮剂量呈正相关。结论: 醋柳黄酮可通过抑制动脉斑块组织中NF-κB活化、降低MCP-1表达, 从而抑制AS斑块的增殖。

关键词 醋柳黄酮; 同型半胱氨酸; 动脉粥样硬化; 核因子-κB; 单核细胞趋化蛋白-1; 兔

Inhibitory Effects of Sindacon on Rabbits Atherosclerosis Induced by Hyperhomocysteinemia

WANG Chen-chen¹, WANG Hua-ting¹, CHEN Li-guang², WANG Hong-yi³, LI Li¹, DIAO Li-xia¹, WANG Zun-zhe⁴, SU Guo-hai¹, ZHANG Wei-dong⁵(1. Dept. of Cardiology, Jinan Central Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250013, China; 2. Shandong Medical Imaging Research Institute, Jinan 250021, China; 3. Qian-foshan Hospitals of Shandong Province, Jinan 250014, China; 4. Dept. of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Baotou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, Inner Mongolia Baotou 014030, China; 5. Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Science, Jinan 250062, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the mechanism of sindacon on rabbits atherosclerosis (AS) induced by high homocysteinemia (Hcy). METHODS: High Hcy and AS model were induced by rabbit abdominal aorta damaged by balloon pull-through technique combined with 0.5% homomethionin diet. 48 rabbits were randomly divided into blank control group (physiological solution of sodium chloride), model group (physiological solution of sodium chloride), positive control group (folic acid 0.58 mg/kg, vitamin B₆ 1.15 mg/kg and vitamin B₁₂ 28.75 μg/kg), sindacon low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.32, 0.76, 1.6 g/kg). They were given relevant medicines intragastrically once a day for consecutive 8 weeks. After lasted medication, plasma concentration of Hcy in rabbits was determined; the morphology alteration of AS was observed by HE staining. The expression of NF-κB and MCP-1 in abdominal aorta was examined by immunohistochemistry. RESULTS: Compared with blank control group, plasma concentration of Hcy, the expression of NF-κB and MCP-1 were increased significantly in model group ($P < 0.01$), and there were significant tunicae intima vasorum thickening and smooth muscle cell arrangement disorder. Compared with model group, plasma concentration of Hcy, the expression of NF-κB and MCP-1 were decreased significantly in sindacon groups and positive control group ($P < 0.01$), the decrease in sindacon high-dose group was more significant than in positive control group ($P < 0.01$); and tunicae intima vasorum thickening was relieved significantly, which was positively correlated with the dose of sindacon. CONCLUSIONS: Sindacon can inhibit the proliferation of AS plaque by inhibiting the activation of NF-κB and decreasing the expression of MCP-1.

KEYWORDS Sindacon; Homocysteine; Atherosclerosis; NF-κB; MCP-1; Rabbits

近年来,国内外大量的临床试验研究证实,血清同型半胱

△ 基金项目:山东省科技攻关计划项目(No.2009GG20002016)

* 硕士研究生。研究方向:冠心病介入基础与临床。电话:0531-85695567。E-mail:wangchenchen66@126.com

通信作者:副教授,硕士研究生导师,博士。研究方向:冠心病介入基础与临床。电话:0531-85695501。E-mail:wanghuating65@163.com

氨酸(Hcy)水平升高是冠心病和动脉粥样硬化(AS)发病的一个独立危险因素^[1],目前该领域的研究已成为当前临床研究和基础研究的热点。在动脉粥样硬化斑块病理生理进程中,各种炎性因子参与其中,对此方面的研究越来越受到人们重视。目前临床尚无有效的方法,如何防治高Hcy所致动脉硬化是目前尚待解决的问题。醋柳黄酮是从野生胡颓子科植物

(俗称沙棘)的果实中提取一种有效成分,具有多种药理作用,临床常用于治疗和预防多种心血管疾病;实验证实其可用于防治心肌缺血/再灌注损伤^[2],具有显著缺氧保护作用,减轻低压缺氧诱导增强的脑血管损伤^[3]。而醋柳黄酮对高Hcy血症致AS有无防治作用,尚不清楚。国外学者证实,叶酸、维生素B₆、维生素B₁₂与血浆Hcy浓度成负相关^[4]。本实验用其作为阳性对照,通过建立高Hcy血症致AS兔模型,探讨醋柳黄酮在高Hcy血症致AS过程中的作用。

1 材料

1.1 仪器

HP1090M高效液相色谱仪(美国惠普公司);DM4000B光学显微镜、Leica QwinV3图像分析软件(德国Leica公司)。

1.2 药品与试剂

醋柳黄酮(四川美大康药业股份有限公司,批号:20120702,规格:每片5mg);叶酸(天津力生制药股份有限公司,批号:1104001,规格:每片5mg);维生素B₆(湖北华中药业有限公司,批号:20120901,规格:每片10mg);维生素B₁₂(山西亨瑞达制药有限公司,批号:120303,规格:每片25μg);Hcy(美国Sigma公司);核因子-κB(NF-κB)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);苏木精染液等(山东省医科院病理研究室)。

1.3 动物

纯种新西兰大白兔,♂,体质量2.0~2.2kg,由济南西岭角养殖繁育中心提供,合格证号为:SCXK(鲁)2010005。

2 方法

2.1 分组与给药

取兔48只随机均分为空白对照组(生理氯化钠溶液)、模型组(生理氯化钠溶液)、阳性对照组(叶酸0.58mg/kg、维生素B₆1.15mg/kg、维生素B₁₂28.75μg/kg)和醋柳黄酮低、中、高剂量组(0.32、0.76、1.6g/kg),每组8只。空白对照组兔给予普通饲料喂养;其余组兔应用4F充盈球囊牵拉法损伤兔腹主动脉内皮以模拟人类AS病变的内皮功能损害,然后应用0.5%高蛋氨酸饲料喂养以模拟人类的高Hcy血症,12周后建立高Hcy血症致AS模型。第13周开始各组兔每日灌胃给予相应药物1次,持续8周。

2.2 Hcy浓度的测定

末次给药后,各组兔耳缘静脉采血2ml,离心并分离血浆,-80℃保存,以高效液相色谱法测定血浆中Hcy浓度。

2.3 组织病理学检测

采用3%戊巴比妥钠麻醉处死各组兔,打开腹腔,剥离腹主动脉,取组织后常规固定,石蜡包埋,5μm连续切片、苏木素-伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察各组兔动脉标本的病理学改变。

2.4 免疫组化检测腹主动脉组织蛋白的表达

采用链霉亲和素-生物素-酶复合物(SABC)法检测。兔腹主动脉组织石蜡切片脱蜡和水化,3% H₂O₂室温20min;蒸馏水冲洗3次,0.1mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗2min×3次;滴加正常羊血清封闭液,封闭20min;弃去多余血清,分别滴加NF-κB、MCP-1兔多克隆一抗,4℃过夜,PBS冲洗2min×3次;然后滴加生物素化山羊抗兔二抗37℃下30min;PBS冲洗2min×3次,滴加SABC37℃下30min,PBS冲洗5min×4次;二氨基苯甲胺(DAB)显色剂室温显色,镜下控制反应时间,HE

轻度复染,脱水,透明,封片,显微镜观察,并进行半定量分析。

2.5 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行统计学处理,评分数据及定量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较用单因素方差分析和LSD法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 血浆中Hcy浓度比较

与空白对照组比较,模型组兔血浆中Hcy浓度明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,醋柳黄酮各剂量组和阳性对照组兔血浆中Hcy浓度明显降低($P < 0.01$),其中醋柳黄酮高剂量组兔血浆中Hcy浓度明显低于阳性对照组($P < 0.01$)。各组兔血浆中Hcy浓度比较见表1。

表1 各组兔血浆中Hcy浓度比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 Comparison of plasma concentration of Hcy in rabbits among those groups($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | Hcy浓度, μmol/L |
|----------|----------------------------|
| 空白对照组 | 9.38 ± 0.21 |
| 模型组 | 34.51 ± 0.61* |
| 醋柳黄酮低剂量组 | 26.45 ± 0.85 [#] |
| 醋柳黄酮中剂量组 | 25.17 ± 0.60 [#] |
| 醋柳黄酮高剂量组 | 23.06 ± 0.75 ^{#a} |
| 阳性对照组 | 24.00 ± 1.01 [#] |

与空白对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: [#] $P < 0.01$;与阳性对照组比较: ^a $P < 0.01$

vs. blank control group: * $P < 0.01$; vs. model group: [#] $P < 0.01$; vs. positive control group: ^a $P < 0.01$

3.2 腹主动脉血管病理变化

空白对照组兔腹主动脉血管无粥样斑块形成,血管壁内膜光滑、均匀、无明显增厚;模型组兔腹主动脉血管内膜均明显增厚,平滑肌细胞排列紊乱;醋柳黄酮各剂量组和阳性对照组兔腹主动脉血管内膜增厚均明显减轻,其中醋柳黄酮高剂量组兔腹主动脉血管内膜轻度增厚,优于醋柳黄酮低剂量组。各组兔腹主动脉的病理变化见图1。

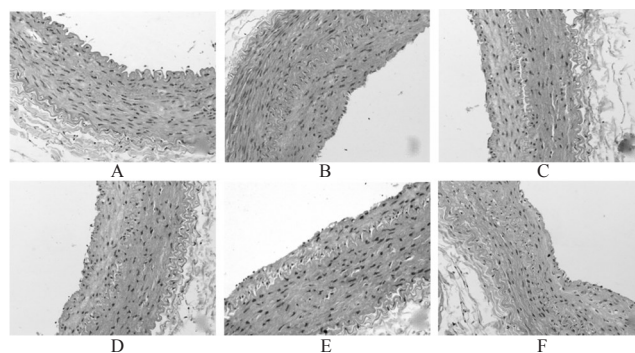


图1 各组兔腹主动脉的病理变化(HE, ×200)

A. 空白对照组; B. 模型组; C. 醋柳黄酮低剂量组; D. 醋柳黄酮中剂量组; E. 醋柳黄酮高剂量组; F. 阳性对照组

Fig 1 Pathological changes of rabbit abdominal aorta in each group(HE, ×200)

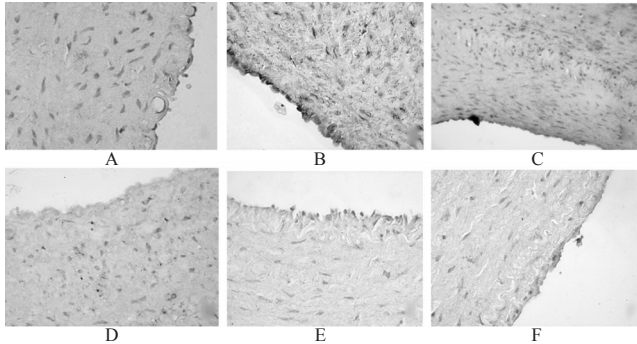
A. blank control group; B. model group; C. sindacon low-dose group; D. sindacon middle-dose group; E. sindacon high-dose group; F. positive control group

3.3 免疫组织化学法测定各组NF-κB及MCP-1表达

NF-κB及MCP-1阳性表达定位于细胞质,呈棕黄色。与

空白对照组比较,模型组兔主动脉内皮细胞中NF-κB、MCP-1表达均明显升高($P<0.01$);与模型组比较,醋柳黄酮各剂量组和阳性对照组兔主动脉内皮细胞中NF-κB、MCP-1表达均明显降低($P<0.01$),且与醋柳黄酮剂量呈正相关;其中醋柳黄酮高剂量组较阳性对照组降低更明显($P<0.01$)。免疫组化法测定结果见图2,半定量结果见表2。

NF-κB:



MCP-1:

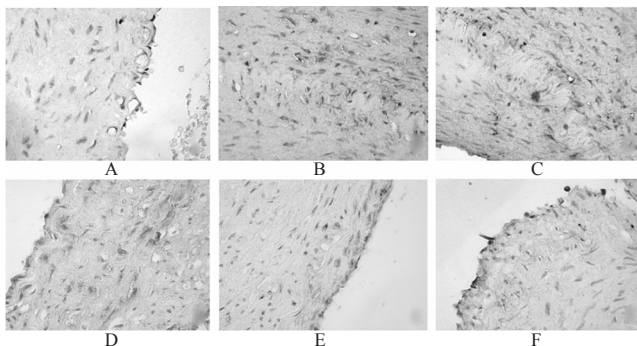


图2 各组兔腹主动脉NF-κB、MCP-1免疫组织化学染色图($\times 400$)

A.空白对照组;B.模型组;C.醋柳黄酮低剂量组;D.醋柳黄酮中剂量组;E.醋柳黄酮高剂量组;F.阳性对照组

Fig 2 The immunohistochemistry staining of NF-κ B and MCP-1 in rabbit abdominal aorta in each group($\times 400$)

A. blank control group; B. model group; C. sindacon low-dose group; D. sindacon middle-dose group; E. sindacon high-dose group; F. positive control group

表2 各组兔腹主动脉中NF-κB、MCP-1的表达情况比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 2 Comparison of expression of NF-κ B and MCP-1 in rabbit abdominal aorta in each group($\bar{x} \pm s, n=8$)

| 组别 | NF-κ B | MCP-1 |
|----------|----------------------------|----------------------------|
| 空白对照组 | 124.9 ± 5.64 | 144.6 ± 3.72 |
| 模型组 | 228.4 ± 6.43* | 245.0 ± 4.90* |
| 醋柳黄酮低剂量组 | 197.0 ± 4.00* | 222.4 ± 4.39* |
| 醋柳黄酮中剂量组 | 173.5 ± 6.83* | 196.5 ± 2.72* |
| 醋柳黄酮高剂量组 | 137.7 ± 3.54* ^Δ | 156.6 ± 7.87* ^Δ |
| 阳性对照组 | 161.1 ± 2.65* | 184.6 ± 3.30* |

与空白对照组比较: * $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.01$;与阳性对照组比较: ^Δ $P<0.01$

vs. blank control group: * $P<0.01$; vs. model group: * $P<0.01$; vs. positive control group: ^Δ $P<0.01$

4 讨论

AS发病机制复杂,流行病学研究表明,AS的主要易患因

素有高胆固醇血症、高血压、糖尿病和吸烟等。高Hcy导致AS的机制是复杂的、多方面的,有文献报道其重要机制包括血管内皮功能障碍^[5]、血管平滑肌细胞增殖与心血管重塑^[6]。通过刺激内皮细胞表达MCP-1、白细胞介素8(IL-8)、血管趋化黏附分子1(VCAM-1)以及E-选择素(E-selectin),增加单核细胞和T细胞黏附主动脉内皮细胞,参与AS形成^[7]。AS是血管损伤后的炎症反应过程,炎症反应贯穿AS始终,从这个角度研究高Hcy致AS的机制更有意义。

NF-κB最早是因调节小鼠B淋巴细胞的κ轻链被大家认识,其基因转录过程是由转录因子的调节蛋白所控制的。这些转录因子在细胞信息传递中起着非常重要的作用,参与机体多种病理生理调节,参与炎症和免疫反应。既往研究证实AS的三大危险因素如高血压、高血脂、高血糖等均能通过激活NF-κB参与AS形成及血管疾病^[8]。NF-κB作为促炎和抗炎基因的直接调节因子,在细胞存活与增殖的调节中发挥重要作用^[9],最新研究显示NF-κB可通过Beclin-1介导的自噬激活,参与机体缺血/再灌注心肌损伤^[10]。MCP-1又称单核细胞趋化和激活因子(MCAF)。目前已知,单核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞、平滑肌细胞等均可被诱导分泌MCP-1。Hcy可刺激内皮细胞从而提高单核细胞趋化作用的MCP-1的表达^[11],提高单核细胞和内皮细胞的黏附,促使单核细胞穿过内皮屏障进一步吞噬脂质形成泡沫细胞,是脂肪条纹形成早期的关键步骤。

本研究结果表明,醋柳黄酮可使血浆中Hcy浓度降低,其抗AS作用可能是通过抑制炎症细胞的黏附而干预AS的病理进程,其机制可能是抑制NF-κB活化、降低MCP-1基因表达。该结果为探讨醋柳黄酮干预高Hcy血症及AS的形成和发展提供了一定的实验依据。

参考文献

- [1] Wang G, Mao JM, Wang X, *et al.* Effect of homocysteine on plaque formation and oxidative stress in patients with acute coronary syndromes[J]. *Chin Med J: Engl*, 2004, 117(11): 1 650.
- [2] 云甜甜,王华亭,王树美,等.醋柳黄酮对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2010, 26(7): 965.
- [3] Purushothaman J, Suryakumar G, Shukla D, *et al.* Modulatory effects of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) in hypobaric hypoxia induced cerebral vascular injury[J]. *Brain Res Bull*, 2008, 77(5): 246.
- [4] Selhub J, Jacques PF, Wilson PW, *et al.* Vitamin status and intake as primary determinants of homocysteinemia in an elderly population[J]. *JAMA*, 1993, 270(22): 2 693.
- [5] Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, *et al.* Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e) inemia[J]. *J Clin Invest*, 2000, 106(4): 483.
- [6] Steed MM, Tyagi SC. Mechanisms of cardiovascular remodeling in hyperhomocysteinemia[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(7): 1 927.
- [7] Koga T, Claycombe K, Meydani M. Homocysteine increases monocyte and T cell adhesion to human aortic endothelial cells[J]. *Atherosclerosis*, 2002, 161(2): 365.

正交设计试验优选去甲斑蝥素在大鼠肝细胞中代谢的影响因素[△]

王晓辉*,高萍#,李光远,王瑛,陶遵威,李毅敏(天津市医药科学研究所,天津 300020)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)41-3869-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.41.10

摘要 目的:研究去甲斑蝥素(NCTD)在大鼠肝细胞中代谢的影响因素。方法:用MTT法检测NCTD对肝细胞的半数抑制浓度(IC₅₀),以细胞接种密度、给药浓度、培养时间为考察因素,以培养体系中NCTD相对含量的峰面积为评价指标,采用气相色谱法检测NCTD的峰面积,正交设计试验筛选NCTD在肝细胞中代谢的影响因素。结果:NCTD对肝细胞的IC₅₀为5.98 μg/ml;在接种密度为75 000个/ml、给药质量浓度为6 g/ml、培养时间为48 h时,NCTD在肝细胞中代谢效率最高。结论:成功获得NCTD在肝细胞中代谢的最优条件。

关键词 去甲斑蝥素;正交设计试验;大鼠肝细胞;代谢

Optimization of Influential Factors of the Metabolism of Norcantharidin in Rat Liver Cells by Orthogonal Test
WANG Xiao-hui, GAO Ping, LI Guang-yuan, WANG Ying, TAO Zun-wei, LI Yi-min (Tianjin Institute for Medical Sciences, Tianjin 300020, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study influential factors for the metabolism of norcantharidin (NCTD) in rat liver cells. METHODS: MTT assay was used to detect the IC₅₀ of NCTD to liver cells. With cell vaccination density, administration concentration and incubation time as factors, using relative content of NCTD in culture system as index, GC was used to detect the peak area of NCTD, orthogonal test was adopted to optimize the influential factors for metabolism of NCTD in liver cells. RESULTS: The IC₅₀ of NCTD to liver cells was 5.98 μg/ml; when vaccination density was 75 000 piece/ml, administration concentration was 6 g/ml and culture time was 48 h, metabolic efficiency of NCTD in liver was the highest. CONCLUSIONS: This study obtains optimal metabolism conditions of NCTD in liver cells.

KEYWORDS Norcantharidin; Orthogonal test; Rat liver cell; Metabolism

去甲斑蝥素(Norcantharidin, NCTD)是斑蝥素的衍生物。与斑蝥素相比,其对泌尿系统的刺激性显著降低,并具有独特的升高白细胞总数的作用,也是我国首先合成的新型抗肿瘤药物^[1]。其衍生物众多而且很多衍生物都表现出抗肿瘤活性^[2],其新型制剂研发工作也取得一些进展^[3]。但由于NCTD自身化学性质活泼、代谢快速以及代谢产物的复杂性,导致其代谢机制和代谢物的深入研究非常困难,限制了NCTD开发应用。

利用细胞株对药物进行代谢的研究方法可以排除体内因素的干扰,为整体药物研发提供可靠的试验数据。对体内代谢率低、毒性大以及缺少灵敏检测方法的药物来说,细胞代谢法更是首选的研究方法。由于细胞对药物的代谢受到细胞接

种密度、给药浓度等多种因素影响,所以本文设计正交设计试验研究NCTD在大鼠肝细胞(Buffalo rat liver, BRL)中代谢的相关影响因素,以提高代谢效率、获得最佳培养方案,为后续及相关研究提供科学依据。

1 材料

1.1 仪器

GC-17A气相色谱仪[中国(上海)岛津有限公司];Infinitel M200酶标仪[帝肯(上海)贸易有限公司];Legend Micro17R高速离心机(美国Thermo Electron Corporation公司,离心半径:78 mm);TMS-PH-3倒置显微镜[尼康仪器(上海)有限公司]。

1.2 药品与试剂

[8] Wilson SH, Caplice NM, Simari RD, et al. Activated nuclear factor-kappaB is present in the coronary vasculature in experimental hypercholesterolemia[J]. *Atherosclerosis*, 2000, 148(1):23.
[9] de Winther MP, Kanters E, Kraal G, et al. Nuclear factor kappaB signaling in atherogenesis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(5):904.

[10] Zeng M, Wei X, Wu Z, et al. NF-κB-mediated induction of autophagy in cardiac ischemia/reperfusion injury[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 436(2):180.
[11] Sung FL, Slow YL, Wang G, et al. Homocysteine stimulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in endothelial cells leading to enhanced monocyte chemotaxis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 216(1/2):121.
[12] Wang G, Siow YL, OK. Homocysteine induces monocyte chemoattractant protein-1 expression by activating NF-kappa B in THP-1 macrophages[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280(6):2 840.

△基金项目:天津市卫生局青年科技基金项目(No.2012KY31)
*助理研究员,硕士。研究方向:药物分析。电话:022-27236182。
E-mail:wangtxh@126.com
#通信作者:副研究员。研究方向:生物监测。电话:022-27236105。E-mail:gaopingcao@sina.com

(收稿日期:2014-02-24 修回日期:2014-03-07)