

青心酮防治 ApoE(-/-)小鼠主动脉粥样硬化斑块形成与脂氧素的关系

陈鲁曼, 张代娟*, 王婷, 王琳(潍坊医学院病理生理教研室, 山东 潍坊 261053)

摘要: 目的 观察青心酮防治 ApoE(-/-)小鼠主动脉粥样硬化(AS)病变形成与脂氧素的关系。方法 取 8 只 8 周龄 C57BL/6 小鼠作空白对照组; 取 24 只 8 周龄的 ApoE(-/-)小鼠, ♂, 随机分成 3 组(每组 8 只): 动脉硬化组(乙醇 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹); 青心酮组(青心酮 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹); 辛伐他汀组(辛伐他汀 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。所有小鼠均以“西方类型膳食”饲养至 16 周。取血检测脂氧素、血脂和 15-脂氧合酶蛋白的含量等; 取主动脉根部行 HE 染色观察 ApoE(-/-)主动脉粥样硬化病变情况; 电镜观察斑块内皮细胞变化。Western blotting 法测定血清中 15-LO 水平。结果 青心酮组脂氧素增加, 血脂含量降低, AS 病灶形成减少, 斑块内皮细胞损伤减轻, 15-脂氧合酶含量减少。结论 青心酮防治 ApoE(-/-)小鼠 AS 病变, 可能与其增加 15-脂氧合酶途径产物——脂氧素有关。

关键词: 青心酮; 脂氧素; 15-脂氧合酶; 动脉粥样硬化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)03-0195-04

Relationship between 3,4-Dihydroxyaceto-phenone Prevention of Atherosclerosis and Lipoxin in ApoE(-/-) mice

CHEN Luman, ZHANG Daijuan*, WANG Ting, WANG Lin(Department of Pathophysiology, Weifang Medical College, Weifang 261053, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the relationship between 3,4-Dihydroxyaceto-phenone(DHAP) prevention of atherosclerosis(AS) and lipoxins(LXs) in ApoE(-/-) mice. **METHODS** There were 8 eight-week-old C57BL/6 mice in the normal control group; 24 eight-week-old male ApoE(-/-) mice were randomly divided into three groups: AS group ($n=8$, ip. alcohol 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹); DHAP treatment group ($n=8$, ip. DHAP 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹); simvastatin treatment group ($n=8$, ip. simvastatin 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹). All mice were fed with a Western diet (21% fat, 0.15% cholesterol) for 16 weeks. Their blood was collected for determination of blood lipids and lipoxin concentration. Sections of aortic root were stained by HE. The structures of cells were observed by electron microscope. Western-blotting was applied to detect 15-LO protein in serum. **RESULTS** The concentration of LXs increased in DHAP-treated group. The concentration of TG and TC decreased in DHAP-treated group; the formation of AS plaque was reduced; the injuries of cells decreased; 15-lipoxygenase also increased at atherosclerosis plaque in DHAP-treated group. **CONCLUSION** It is suggested that DHAP could be used effectively for the prevention and treatment of AS, possibly through promoting the 15-lipoxygenase product synthesis of anti-inflammatory lipoxin pathway.

KEY WORDS: 3,4-dihydroxyacetophenone; lipoxins; 15-lipoxygenase; atherosclerosis

脂氧素(lipoxins, LXs)可以通过 15-脂氧合酶(15-lipoxygenase, 15-LO)途径合成, 发挥广泛强效的抗炎促消退作用^[1]。目前认为动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的形成是一种炎症性病变的过程, 并且 TNF- α 、IL-8 表达增多。LXs 作为一类重要的内源性脂质抗炎(anti-inflammatory)介质可以下调 TNF- α 、IL-8 表达, 进而引发一系列炎症消退事件^[2], 对 AS 的防治发挥了十分重要的作用。本课题组前期工作观察到活血化瘀中药成分青心酮(3,4-dihydroxyaceto-phenone, DHAP)具有较好的抗炎作用^[3]。DHAP 能否通过促进 15-LO 合成脂氧素影响 AS 炎症反应的发生发展, 目前尚无这方面的报道。本实验拟对比性研究 DHAP 及辛伐他汀

对 ApoE(-/-)小鼠 15-LO、LXs 等的影响, 探讨 DHAP 对 AS 的防治机制。

1 材料和方法

1.1 动物

C57BL/6 小鼠、ApoE(-/-)小鼠, ♂, 8 周龄, SPF 级, 体重(18.14±0.70)g, 购于北京华阜康生物技术有限公司, 实验动物合格证号: SCXK(京)2009-0007。

1.2 药品与试剂

DHAP(日本 TCI, 批号: D2345-5G); 辛伐他汀粉剂(南京德宝生化有限公司, 批号: No100314); 小鼠 LXs ELISA 试剂盒及免疫组化相关试剂(上海瑞齐生物科技有限公司)。

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2009CQ013)

作者简介: 陈鲁曼, 女, 硕士 Tel: (0536)8462020
Tel: (0536)8462020 E-mail: zdj_zhangdaijuan@sohu.com

E-mail: xiaoman8081@126.com

*通信作者: 张代娟, 女, 硕士, 讲师

1.3 仪器

RX-2000 全自动生化测定仪(Technicon 公司, USA); RT2100C 全自动酶标仪(German); 垂直型电泳槽和湿式电转膜槽(Hoefer, USA); 电泳仪(DF-C 型, 东方特力科贸中心); 转膜仪(BIO-RAD, USA); KD 病理切片机(科迪仪器设备有限公司); ME1000+YG-2 型电镜(USA)。

1.4 小鼠分组

本实验取 8 只 8 周龄 C57BL/6 小鼠, ♂, 作空白对照组(腹腔注射生理盐水 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹); 取 24 只 8 周龄 ApoE(-/-)小鼠, ♂, 随机分成 3 组: AS 组(n=8) 腹腔注射乙醇 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 建立小鼠 AS 模型; DHAP 组(n=8), 腹腔注射 DHAP 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹; 辛伐他汀组(n=8), 腹腔注射辛伐他汀 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹。根据预实验结果得出 DHAP 剂量 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 根据临床推荐成人每日用药的常用量换算辛伐他汀剂量^[4]。所有实验小鼠均为 SPF 级别, 到达动物室后在同样温度、湿度和光照等环境条件下适应 3 d, 进食进水正常, 体重稳定后开始进入实验程序。所有小鼠自由进食饮水, 将实验用药溶于乙醇, 根据当日动物体重给药。所有实验小鼠均饲以含脂肪 21%, 胆固醇 0.15% 的“西方类型膳食”饲料至 16 周。

1.5 实验取材

所有小鼠禁食过夜(不禁水), 称体质量。经小鼠眼眶静脉丛采血, 离心分离血清, 测定血清 LXs、血脂含量。取眼球血后用 10%水合氯醛 350 mg·kg⁻¹ 对小鼠进行腹腔注射麻醉, 经 10%中性福尔马林灌注固定后取心脏连主动脉, 剥离血管外附着组织, 行石蜡包埋, 自主动脉根部向下行连续切片, 每只小鼠切片 50 张, 每张切片 2 个组织面, 切片厚 5 μm, 每间隔 6 张取 1 张, 行 HE 染色, 光镜观察血管壁 AS 病变的组织学形态。行电镜切片的动物取标本时先用 2.5%戊二醛磷酸缓冲固定液(pH 7.4)进行前固定, 再取主动脉血管用 2.5%戊二醛磷酸缓冲固定

液固定后环氧树脂 618 包埋, 然后行超薄切片、染色, 电镜下观察血管内皮细胞结构变化。

1.6 酶联免疫吸附实验(ELISA)

采用双抗体夹心法, 参考试剂盒说明书, 每孔加 100 μL 待测样品或不同浓度标准品, 每个稀释度 2 个复孔, 室温孵育 90 min, 洗板 4 次。每孔加入检测工作液, 室温孵育 60 min, 洗板 4 次。加入底物, 室温避光 15 min, 加入终止液, 混匀后立即测量 OD450 值。根据所做的标准曲线, 获得样品中所含 LXs 的量。根据所做的标准曲线, 获得样品中 LXs 的量。血清总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)在全自动生化分析仪进行测定。

1.7 Western blotting 法测定血清中 15-LO 的水平

各组血样在室温下 6 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液。SDS-PAGE(10%)电泳分离蛋白。之后将蛋白从电泳凝胶中转移到 NC 膜上。再用 5%脱脂奶粉封闭 30 min, I 抗 37 ℃ 2 h, TBS 冲洗 3 次, 每次 15 min, 碱性磷酸酶标记 II 抗 37 ℃ 1h, TBS 冲洗 4 次, 每次 15 min, NBT 方法显色 10 min, 扫描分析。

1.8 统计分析

全部数据用 SPSS 13.0 统计软件进行处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 组间比较用 LSD 检验分析。

2 结果

2.1 DHAP 对 ApoE(-/-)小鼠 TC、HDL-C、LDL-C、TG 的影响

DHAP 对 ApoE(-/-)小鼠血脂有抑制作用。与空白对照组相比, AS 组血脂 TC、TG、LDL-C 均增加($P<0.05$), 血脂 HDL-C 有减少但无统计学意义($P>0.05$)。DHAP 组和辛伐他汀组中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 较动脉硬化组下降($P<0.05$), 但其中 TC、TG、LDL-C 高于空白对照组($P<0.05$), HDL-C 也低于空白对照组($P<0.05$), 结果见表 1。

表 1 DHAP、辛伐他汀对 ApoE(-/-)小鼠 TC、HDL-C、LDL-C、TG 的影响(n=8, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 The effects of DHAP and simvastatin on serum TC, HDL-C, LDL-C, TG in ApoE(-/-) mice(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹	TC /mmol·L ⁻¹	LDL-C/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	HDL-C/mmol·L ⁻¹
空白对照组	-	1.96±0.16	0.45±0.15	1.31±0.11	1.37±0.14
AS 组	-	8.10±0.05 ¹⁾	5.15±0.20 ¹⁾	2.21±0.23 ¹⁾	1.29±0.15
DHAP 组	20	1.55±0.10 ¹⁾²⁾	0.34±0.14 ¹⁾²⁾	0.88±0.10 ¹⁾²⁾	0.90±0.12 ¹⁾²⁾
辛伐他汀组	20	0.60±0.07 ¹⁾²⁾	0.44±0.12 ¹⁾²⁾	0.34±0.07 ¹⁾²⁾	0.11±0.05 ¹⁾²⁾

注: 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与 AS 组比较, ²⁾ $P<0.05$

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with AS group, ²⁾ $P<0.05$

2.2 DHAP 对 ApoE(-/-)小鼠血清 LXs 的影响

与空白对照组比较, AS 组的 LXs 与空白对照组比较增多($P<0.05$), DHAP 组、辛伐他汀组与 AS 组相比均增加($P<0.05$), 同时也高于正常空白对照组($P<0.05$), 均有统计学意义, 结果见表 2。

表 2 DHAP、辛伐他汀对 ApoE(-/-)小鼠血清 LXs 的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 The effects of DHAP and simvastatin on serum LXs in ApoE(-/-) mice($n=8, \bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	血清 LXs/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
空白对照组	—	11.32 ± 0.15
AS 组	—	$15.49 \pm 0.35^{1)}$
DHAP 组	20	$24.46 \pm 0.26^{1)2)}$
辛伐他汀组	20	$26.23 \pm 0.11^{1)2)}$

注: 与空白对照组比较, $^1)P<0.05$; 与 AS 组比较, $^2)P<0.05$
Note: Compared with control group, $^1)P<0.05$; compared with AS group, $^2)P<0.05$

2.3 DHAP 对 ApoE(-/-)小鼠主动脉根部斑块病理改变的影响

HE 染色结果显示: 空白对照组主动脉根部内膜光滑, AS 组内膜增厚, 多处形成较大斑块, 可见较多泡沫细胞; DHAP 组和辛伐他汀组内膜也增厚, 但斑块数量及总体积较 AS 组减少, 泡沫细胞较少, 结果见图 1。

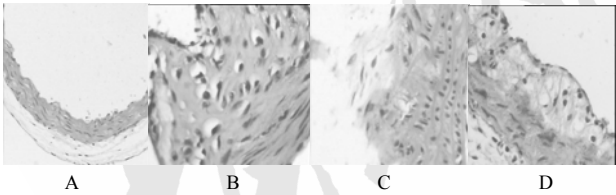


图 1 各组小鼠主动脉根部横断面 HE 染色病理切片(400×)
A-空白对照组; B-动脉硬化组; C-青心酮治疗组; D-辛伐他汀治疗组
Fig 1 The effects of DHAP on AS plaque (HE Method, 400×)
A-control group; B-AS group; C-DHAP group; D-Simvastatin group

2.4 DHAP 对 ApoE(-/-)小鼠主动脉 AS 斑块中内皮细胞的影响

电镜观察空白对照组内皮细胞边缘清楚, 细胞器结构正常。与空白对照组比较, AS 组内皮细胞空泡样变, 线粒体髓样变, 细胞质电子密度低。DHAP 组和辛伐他汀组也有类似改变, 但较 AS 组变化轻, 结果见图 2。

2.5 DHAP 对 ApoE(-/-)小鼠血清中 15-LO 水平的影响

与空白对照组比较, AS 组的 15-LO 表达明显增多, 印迹最明显。DHAP 组、辛伐他汀组与 AS 组的 15-LO 表达相比均相应减少, 同时两组的 15-LO 表达也高于空白对照组, DHAP 组与辛伐他汀组的 15-LO 表达没有太大差异, 结果见图 3。

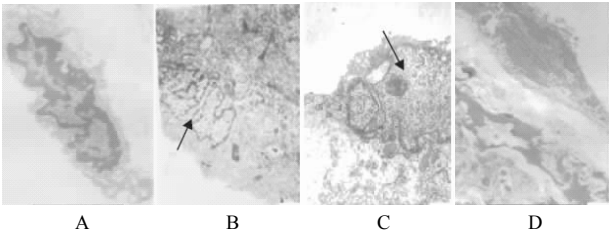


图 2 DHAP 和辛伐他汀对 ApoE 基因敲除小鼠斑块中内皮细胞的影响(7000×)
A-空白对照组; B-动脉硬化组; C-青心酮治疗组; D-辛伐他汀治疗组

Fig 2 The effects of DHAP and simvastatin on endothelial cells at atherosclerosis plaque of ApoE(-/-)mice (7000×)
A-control group; B-AS group; C-DHAP group; D-simvastatin group

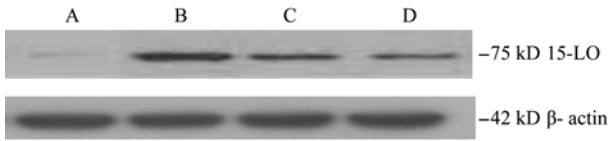


图 3 DHAP 和辛伐他汀对 ApoE 基因敲除小鼠血清 15-LO 的影响
A-空白对照组; B-动脉硬化组; C-青心酮治疗组; D-辛伐他汀治疗组

Fig 3 Effects of DHAP and simvastatin on serum 15-LO in ApoE(-/-) mice
A-control group; B-AS group; C-DHAP group; D-simvastatin group

3 讨论

AS 是一种严重危害人类健康的常见疾病, 1999 年 R.ROSS 教授在其损伤反应学说的基础上, 明确提出“AS 是一种炎症性疾病”^[4], 但具体机制尚未完全阐明。有研究表明炎症的缓解有赖于炎性渗出物中炎症介质成分的变化^[5]。这些炎症介质可以放大炎症信号发挥特定的作用^[6], 其中就有 LXs: 它是在人体内首先被发现的具有抗炎和促进炎症消退的脂类介质, 由花生四烯酸通过脂氧合酶两次催化形成的^[7], 可以抑制胃肠炎、哮喘、角膜炎、缺血再灌注损伤、腹膜炎等炎症过程的病理转归^[8-10], 被称为炎症中的“刹车信号”, 被发现对防治 AS 有一定的作用。从细胞的角度来看, 其中一条合成 LXs 的途径是由 15-LO 参与完成的, 15-LO 通过增加合成 5-LO 的底物达到加快合成 LXs 的目的。大量的动物实验表明, 15-LO 的活性增高或者过于表达能加速早期 AS 的发生。例如在兔的 AS 斑块中发现具有酶活性的 15-LO 蛋白表达^[11], 而敲除 15-LO 基因可显著延缓 AS 的发生与发展^[12]。AS 是心脑血管疾病的病理基础, 机制并未明确包括天然免疫和获得性免疫在内的免疫机制在 AS 中的作用^[13]。对 15-LOX 的表达调控研究在 AS 病因研究中有重要意义。

DHAP, 又名 3, 4-二羟基苯乙酮, 是从具有活血化瘀的中药毛冬青的根中提取出的有效成分, 研究发现其在治疗冠心病、妊高征等疾病时均获得较好的临床疗效, 同时还对舒张血管, 抑制血管平滑肌增殖等有较好的效果^[3]。他汀类药物即 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原酶抑制剂已被大规模临床试验证实, 除能有效降低胆固醇外, 还可使斑块消退, 进而减少冠心病临床事件的发生并降低心血管病死亡率^[12,14]。本实验中用 ApoE(-/-) 小鼠作为动物模型, 经动物实验证实应用“西方类型膳食”饲养可以加快 AS 的形成, 短时间即可出现较严重的高脂血症, 并容易在主动脉根部形成 AS 斑块, 且斑块的分布与人类动 AS 斑块的分布极为相似。笔者利用 ApoE(-/-) 小鼠模型观察 DHAP 和辛伐他汀对主动脉粥样斑块形成的影响, 通过研究发现 DHAP 与辛伐他汀一样都可以缩小 ApoE(-/-) 小鼠主动脉所形成的粥样硬化斑块; 实验还通过对血清中 LXs 和 15-LO 含量变化的深入研究发现 DHAP 可能是通过促进 15-LO 合成 5-LO 的底物, 一方面减少 15-LO 含量, 一方面还可以促进 5-LO 合成脂氧素, 两方面来增强抗炎作用, 减少斑块的形成。但是具体机制和经过还有待以后进一步研究。

REFERENCES

- [1] ZHANG L, WAN J Y, YE D Y, et al. Lipoxin and Inflammation subside [J]. Chemistry of life(生命的化学), 2004, 24(1): 61-63.
- [2] NAIKI Y, SORRENTINO R, WONG M H, et al. TLR/MyD88 and liver X receptor alpha signaling pathways reciprocally control Chlamydia pneumoniae-induced acceleration of

- atherosclerosis [J]. Immunol, 2008, 181(10): 7176-7185.
- [3] WU P, HUANG Y P, YE D Y, et al. Progress in studies on mechanism of promoting blood circulation and removing blood stasis of 3,4-dihydroxyacetophenone [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2001, 32(3): 277-279.
- [4] ROSS R. Atherosclerosis--an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.
- [5] CHARLES N, SERHAN, NAN CHIANG AND THOMAS E, et al. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and proresolution lipid mediators [J]. Immunology, 2008, 8(5): 349-361.
- [6] SERHAN C N. Guetsted. Special Issue on Lipoxins and Aspirin Triggered Lipoxins Prostaglandins Leukot [J]. Essent Fatty Acids, 2005, 73(3-4): 141-162.
- [7] CELIK G E, ERKEKOL F O, MISIRLIGIL Z, et al. Lipoxin A4 level in asthma: relation with disease severity and aspirin sensitivity [J]. Clinical and Experimental Allergy, 2007, 37(10): 1494-1501.
- [8] YACIOUBIAN S, SERHAN C N. New endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators: implications for rheumatic diseases [J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007, 3(10): 570-579.
- [9] HENNEKENS CH, SECHENOVA O, HOLLAR D, et al. Dose of aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease: current and future directions [J]. Cardiovasc Pharmacol Ther, 2006, 11(3): 170-176.
- [10] FAROOQUI A A. Lipid mediators in the neural cell nucleus: their metabolism, signaling, and association with neurological disorders [J]. Neuroscientist, 2009, 15(4): 392-407.
- [11] HUO Y, ZHAO L, H YMAN M C, et al. Critical role of macrophage 12/15 lipoxygenase for atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Circulation, 2004, 110(14): 20-24.
- [12] HANSSON G K, LIBBY P, SCHONBECK U, et al. Innate and adaptive immunity in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Circ Res, 2002, 91(4): 281-291.
- [13] DAI X H, ZHOU J P. Quantitative RT-PCR to detect coronary artery disease patients with 15 - lipoxygenase gene expression studies [J]. Chongqing Med(重庆医学), 2010, 39(1): 95-97.
- [14] WANG J J, ZHOU Y Y, FAN Y B. Effects of non-ephedrine alkaloids of ephedra sinica stapf on cholesterol in mice [J]. Her Med(医药导报), 2011, 30(2): 187-190.

收稿日期: 2011-07-14