

增高^[8]。ALT 和 AST 是临床上判断肝损害进展的较好指标^[9]。MDA 是过氧化脂质(LPO)主要成分之一, 通过测定其在血与肝组织含量, 可反应机体和肝脏脂质过氧化损伤程度, 间接反映出肝细胞毒性损伤程度。GSH-PX 为机体抗氧化系统中有有机组成部分, 观察血、肝组织 GSH-PX 活性变化一定程度上可反映氧化损伤的程度^[10]。故本研究选取以上 4 种指标作为反应, 应用 Caco-2 细胞模型评估黄药子肝毒性的评价指标。实验结果表明, 黄药子醇提物 Caco-2 细胞摄取液对正常人肝细胞 HL-7702 和肝癌细胞 HepG2 细胞的活力均有影响, 细胞上清液中 ALT、AST 和 MDA 含量增加, GSH-PX 含量减少, 与文献报道的结果基本一致^[5,11]。证明应用 Caco-2 细胞模型评估黄药子的肝细胞损伤有一定的可行性。黄药子醇提物 Caco-2 细胞摄取液对 HL-7702 和 HepG2 细胞有毒性, 以上结果为阐明黄药子肝毒性的物质基础提供了依据。

REFERENCES

- [1] WANG J Z, LIU S M, ZHAO Y, et al. Experimental studies on liver cell injury induced by diterpene lactones extracted from *Dioscorea bulbifera* [J]. Adv Drug React J(药物不良反应杂志), 2009, 11(1): 13-16.

- [2] LIANG Z W, CUI L X. Experience on the intoxication and rescue of *Dioscorea bulbifera* L. [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2001, 18(7): 23-24.
- [3] SUN H D, CHOW E C Y, LIU S J, et al. The Caco-2 cell monolayer: usefulness and limitations [J]. Expert Opin Drug Met, 2008, 4(4): 395-411.
- [4] WANG J M, JI L L, BRANFORD-WHITE C J, et al. Antitumor activity of *Dioscorea bulbifera* L. rhizome in vivo [J]. Fitoterapia, 2012, 83(2): 388-394.
- [5] WANG J M, JI L L, LIU H, et al. Study of the hepatotoxicity induced by *Dioscorea bulbifera* L. rhizome in mice [J]. BioSci Trends, 2010, 4(2): 79-85.
- [6] JIANG M, XIONG N N, LIU S L, et al. Adverse drug reaction of compound prescription of Huangyaozi (*Dioscorea Bulbifera* L.) in clinical trial and its management [J]. Chin J Evid Base Med(中国循证医学杂志), 2004, 4(4): 255-257.
- [7] FU D H, LI Y, WANG E L, et al. Transepithelial transport of centaureidin across Caco-2 cell monolayers [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(12): 1076-1080.
- [8] NIEMELA O, ALATALO P. Biomarkers of alcohol consumption and related liver disease [J]. Scand J Clin Lab Invest, 2010, 70(5): 305-312.
- [9] NYBLOM H, BJORNSSON E, SIMREN M, et al. The AST/ALT ratio as an indicator of cirrhosis in patients with PBC [J]. Liver Int, 2006, 26(7): 840-845.
- [10] ROMERO F J, BOSCH-MORELL F, ROMERO M J, et al. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease [J]. Environ Health Perspect, 1998(106): 1229-1234.
- [11] WANG J, LIANG Q, JI L, et al. Gender-related difference in liver injury induced by *Dioscorea bulbifera* L. rhizome in mice [J]. Hum Exp Toxicol, 2011, 30(9): 1333-1341.

收稿日期: 2012-06-26

山楂叶总黄酮对家兔动脉粥样硬化作用的机理研究

匡荣^{1,2}, 陈男¹, 康桦², 邓祖跃², 王丹², 张劲松², 朱社敏²(1.浙江工业大学药学院, 杭州 310014; 2.浙江省食品药品检验所, 杭州 310004)

摘要: 目的 研究山楂叶总黄酮(total flavones of crataegus leaves, TFCL)对家兔动脉粥样硬化(AS)形成抑制作用的机理。方法 用复方高脂饲料复制家兔 AS 模型并同时给予 TFCL 80 d, 取主动脉进行病理切片和大体观察, 常规检测血脂和血清中两种抗氧化酶 SOD、GSH-P_x 的活性和 NO 水平, ELISA 法测定 C 反应蛋白(CRP)、IL-6 及 TNF- α 的量, RT-PCR 法检测 COX-Ⅱ mRNA 表达。结果 复方高脂饲料饲喂家兔 80 d 可以形成明显的 AS, TFCL 在减轻 AS 的同时能够降低血清中 NO、CRP、IL-6 及 TNF- α 的水平, 升高 SOD 和 GSH-P_x 的活性, 下调 COX-Ⅱ mRNA 的表达。结论 TFCL 对复方高脂饲料形成的家兔 AS 具有一定的拮抗作用, 提高抗氧化酶的活性、抑制炎症因子的生成可能是 TFCL 抗家兔 AS 的作用机理。

关键词: 动脉粥样硬化; 山楂叶总黄酮; C 反应蛋白; IL-6; TNF- α ; COX-Ⅱ mRNA

中图分类号: R285.5

文献标志码:

文章编号: 1007-7693(2013)04-0372-04

Mechanisms of Total Flavones of Crataegus Leaves on Experimental Atherosclerosis in Rabbits

KUANG Rong^{1,2}, CHEN Nan², KANG Hua², DENG Zuyue², WANG Dan², ZHANG Jinsong², ZHU

基金项目: 浙江省实验动物科技计划项目(2007F80018)

作者简介: 匡荣, 男, 博士, 副主任药师, 硕士 Tel: 13989899796 E-mail: kuangrong@zjy.org.cn

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the mechanisms of total flavones of crataegus leaves (TFCL) on experimental atherosclerosis(AS) in rabbits. **METHODS** The typical atherosclerosis in rabbits was formed by administrating with high-lipid food or together with TFCL for 80 d. The section of aortia were examined pathologically. The activities of SOD, GSH-P_x, the level of NO, CRP, IL-6 and TNF- α in the serum and the relative amount of COX-II mRNA in aortia of atherosclerotic rabbits were detected. **RESULTS** Atherosclerotic rabbit models were replicated by feeding high-lipid food. TFCL could inhibit the formation of AS with decreasing the level of NO, CRP, IL-6 and TNF- α , increasing the activities of SOD and GSH-P_x, down regulating the expression of COX-II mRNA. **CONCLUSION** The protective effect of TFCL on atherosclerosis may result from elevating the activities of oxygen enzymes but suppressing the production of inflammation factor.

KEY WORDS: atherosclerosis; TFCL; CRP; IL-6; TNF- α ; COX-II mRNA

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一个缓慢而复杂的病理过程,与氧自由基产生、炎症细胞浸润等多种因素有关^[1-2]。因此,阻抑以上环节对防止或延缓 AS 的发生发展具有重要意义。山楂叶总黄酮(total flavones of crataegus leaves, TFCL)临床主要用于心肌缺血的治疗^[3-4]。本实验室已证实其具有抗实验性大鼠高脂血症和抗脑缺血的作用^[5],也报道了其抗家兔 AS 与细胞凋亡的关系^[6]。本实验主要研究其抗家兔 AS 与氧化应激、炎症的关系,进一步探讨 TFCL 的作用机理。

1 材料

1.1 动物

新西兰兔,♂,体质量2.0~2.5 kg,浙江省余姚市泗门镇实验兔养殖场,动物生产许可证号:SCXK(浙)2006-0026,使用许可证号:SYXK(浙)2008-0118。

1.2 试剂与仪器

SOD, GSH-P_x, NO检测试剂盒(南京建成生物技术有限公司); TNF- α , IL-6, CRP, ELISA免疫测定试剂盒(上海森雄科技公司); RNA提取和扩增试剂盒(杭州新捷生物科技公司)。7020型全自动生化分析仪(日本日立公司); 7020全波长酶标仪(美国Molecular Devices); MAX190 PCR仪(ABI); PRISM 7000凝胶成像系统(美国Bio-Rad)。

1.3 药物

TFCL购自山西中晋制药有限公司,批号:200801016,黄酮含量:92%(分光光度法)。

2 方法

2.1 动物分组与剂量计算

将 30 只兔按体质量随机分为 3 组:正常对照组采用基础饲料;模型组采用复方高脂饲料(基础饲料 89.5%+胆固醇 1%+蛋黄 1.5%+猪油 8%);

TFCL 组采用复方高脂饲料+0.5%TFCL。自由饮水,单笼喂养。本实验室家兔饲养的资料数据显示,一般家兔每日摄食量为 130~150 g, TFCL 在饲料中的含量为 0.5%,即每日摄取 650~750 mg, TFCL 的日摄入量为 260~300 mg·kg⁻¹(家兔体重按平均 2.5 kg 计算)。

2.2 病理标本制作

实验至80 d,沿兔耳中动脉注入10 mL空气处死,取主动脉大体标本(从主动脉弓至髂动脉分叉处)置入10%中性福尔马林液中固定。取主动脉弓2 cm片段,经脱水、浸蜡、包埋、切片等步骤制成石蜡切片,进行HE染色,光镜下观察形态学改变。

2.3 血标本的采集和指标测定

于处死前抽取空腹静脉血。全自动生化分析仪测定血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)及低密度脂蛋白(LDL-C)水平;黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性,硝酸还原酶法测定 NO; ELISA法测定CRP、TNF- α 和IL-6。

2.4 COX-II mRNA的表达的检测

取胸主动脉弓位置的动脉约1.5 cm(约100 mg)放入液氮中保存。实验时,加液氮充分研磨,柱纯化法提取主动脉的Total RNA,引物由上海生物工程公司按下列序列合成,上游序列:5-AACG AGTACCGCAAACGC-3,下游序列:5-GCTGAGG ATCTGGGACGT-3。扩增条件:① 42 °C 3 min; ② 94 °C 3 min; ③ 94 °C 20 s, 60 °C 1 min循环35次; ④ 72 °C 延伸5 min。扩增产物-70 °C保存。PCR产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳, DNA条带光密度用凝胶成像分析系统进行半定量分析。目的mRNA的表达水平用目的mRNA/GAPDH mRNA的比值来表示。

2.5 统计学分析

本试验所有数据表示为 $\bar{x} \pm s$ ，采用SPSS软件对各组数据进行处理。组间差异的比较采用方差分析。

3 结果

3.1 TFCL对家兔AS和血脂的影响

肉眼观察，用手术剪将动脉管腔剪开，再用清水缓缓冲洗，可见模型组主动脉增粗变硬，管壁明显增厚，白色粥样硬化斑块明显隆起，融合呈大片状。染色后，斑块呈红色，TFCL组粥样硬化斑块面积明显减小。见图1。

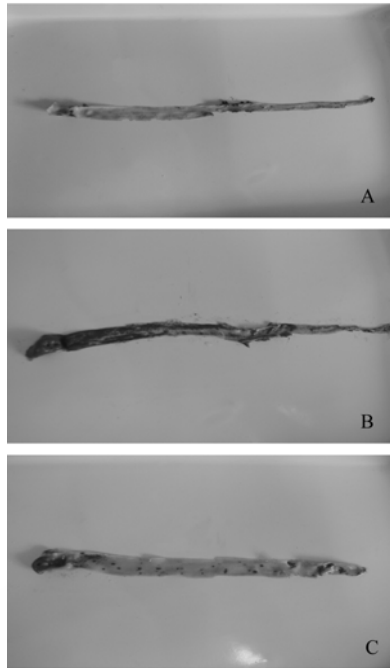


图1 兔主动脉大体标本 Herxheimers 液染色照片

A-空白对照组；B-模型组；C-山楂叶总黄酮组

Fig 1 The Herxheimers dyeing photos of rabbit aorta specimens

A-blank group; B-model group; C-TFCL group

血脂检测结果显示，TFCL组与模型组比较，TG显著降低、HDL-C和HDL-C/TC显著升高。组织病理学检测显示，TFCL组主动脉粥样硬化斑块、内膜中脂质沉积及泡沫细胞浸润等均较模型组轻，具体病理图和血脂检测结果见本实验室先期发表的文献^[6]。

3.2 TFCL对AS家兔血清SOD、GSH-Px活性和NO水平的影响

复方高脂饲料饲喂家兔80 d，血清中2种抗氧化酶SOD和GSH-Px的活性显著降低，NO的水平明显升高，给予TFCL后，2种抗氧化酶活性均明显提高，NO水平则明显降低。结果见表1。

表1 TFCL对AS家兔血清SOD、GSH-Px活性和NO水平的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of TFCL on SOD, GSH-Px activity and NO level in AS rabbit($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	SOD/U·mL ⁻¹	GSH-Px/U·mL ⁻¹	NO/ μ mol·L ⁻¹
正常对照组	257.4 $\pm$ 47.8	172.9 $\pm$ 8.3	145.3 $\pm$ 34.3
模型组	105.5 $\pm$ 8.8 ¹⁾	140.2 $\pm$ 19.4 ¹⁾	516.5 $\pm$ 98.6 ¹⁾
TFCL组	148.3 $\pm$ 35.3 ²⁾	158.9 $\pm$ 15.3 ²⁾	335.8 $\pm$ 131.0 ²⁾

注：与正常对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.05$

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$

3.3 TFCL对AS家兔血清CRP、IL-6及TNF- α 水平的影响

复方高脂饲料饲喂家兔80 d，血清中CRP、IL-6及TNF- α 水平均显著提高，给予TFCL后，血清中CRP、IL-6及TNF- α 水平均明显降低。见表2。

表2 TFCL对AS家兔血清CRP、IL-6及TNF- α 水平的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of TFCL on CRP, IL-6 and TNF- α level in AS rabbit($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	CRP/ng·mL ⁻¹	IL-6/ng·mL ⁻¹	TNF- α /ng·mL ⁻¹
正常对照组	10.9 $\pm$ 4.7	259.5 $\pm$ 97.6	410.7 $\pm$ 128.3
模型组	18.2 $\pm$ 3.3 ¹⁾	513.5 $\pm$ 109.8 ¹⁾	562.4 $\pm$ 92.1 ¹⁾
TFCL组	13.0 $\pm$ 5.1 ²⁾	379.6 $\pm$ 83.5 ²⁾	473.2 $\pm$ 98.0 ²⁾

注：与正常对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.05$

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$

3.4 TFCL对AS家兔主动脉COX- II mRNA表达的影响

家兔饲喂复方高脂饲料80 d后，主动脉COX- II mRNA表达比正常组显著增加，COX- II/GAPDH由正常对照组的0.52上升到0.93($P<0.01$)。TFCL能使COX- II mRNA表达减少，COX- II/GAPDH下降为0.53($P<0.01$)。结果见图2。

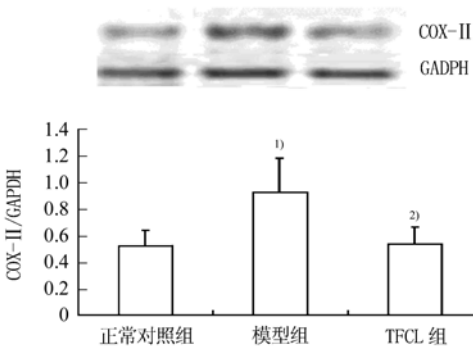


图2 TFCL对AS家兔主动脉COX- II mRNA表达的影响与正常对照组比较，¹⁾ $P<0.01$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.01$

Fig 2 Effects of TFCL on COX- II mRNA expressive in AS rabbit

Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.01$; compared with model group, ²⁾ $P<0.01$

4 讨论

近年研究认为,氧化损伤在 AS 的发生发展起重要作用,和内皮细胞凋亡及炎症密切相关。SOD 是清除超氧阴离子自由基损害的主要活性酶,GSH-Px 是机体广泛存在的催化过氧化氢分解的酶,二者反映了体内的抗氧化能力。研究表明,AS 家兔血清中 2 种抗氧化酶活性明显降低,TFCL 可以明显增加 SOD 及 GSH-Px 活力,说明提高以上 2 种抗氧化酶的活性是 TFCL 抗 AS 的部分机制。

研究表明,AS 是多种炎症因子参与下的持续炎症损害,炎症因子在 AS 的病变过程中起到重要作用。TNF- α 是触发与炎症有关的许多细胞因子释放的关键物质,它可通过直接的细胞毒性作用破坏血管内皮细胞结构和功能的完整性^[7-8]。NO 介导内毒素(LPS)、NF- κ B、IL-1 等细胞因子的病理作用。IL-6 由巨噬细胞和成纤维细胞分泌,在 AS 斑块中大量存在,能刺激平滑肌细胞增殖和诱导肝细胞产生 CRP。CRP 是最具代表性的炎症标志物,可直接参与 AS 的发生、发展^[9]。本研究发现,AS 兔血浆中 NO、CRP、IL-6 及 TNF- α 含量明显升高,可能原因是,高脂饲料引起的高血脂以及高血脂中被氧化修饰的脂蛋白长期刺激损伤了血管内皮,引起炎症反应,血管组织中炎症反应的持续存在导致炎症组织中单核巨噬细胞活化,产生 TNF- α 、IL-6,IL-6 诱导肝细胞产生大量 CRP,这些炎症因子均导致 AS 的一系列炎症反应过程。本研究中 AS 兔饲喂 TFCL 后,兔血浆 NO、CRP、IL-6、TNF- α 含量明显下降,从而解除或缓解了高脂血症作为炎症反应过程的始动影响,其他原因尚待研究。COX-2 是花生四烯酸合成前列腺素过程的限速酶,多由炎性细胞因子诱导并在炎症部位表达。研究证实,COX-2 在 AS 血管中的单核巨噬细胞、内皮细胞、平滑肌细胞广泛表达。COX-2 不仅介导全身的炎症反应,而且在 AS 病变处表达,并受多种炎性细胞因子调节,其代谢产物前列腺素也具有促进炎症作用,包括增加血管通透性、促进单核细胞黏附、诱导巨噬细胞化

学趋化性和迁移、刺激炎症因子产生,激活基质金属蛋白酶增加 AS 斑块的不稳定性等,对 AS 的形成和发展具有重要影响。研究发现,长期给予复方高脂饮食后,家兔主动脉 COX-2 表达明显增加,和文献报道一致^[10],TFCL 能下调 COX-2 的表达,但下调的机理有待进一步研究。

综上所述,TFCL 通过提高氧化酶的活性、减少炎症因子的生成并下调 COX-2 表达从而发挥抗 AS 的作用。

REFERENCES

- [1] BROWN M S, GOLDSTEIN J L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis [J]. *Annu Rev Biochem*, 1983, 52(1): 223-261.
- [2] CHEN L M, ZHANG D J, WANG T, et al. Relationship between 3,4-dihydroxyacetophenone prevention of atherosclerosis and lipoxin in ApoE(-/-) mice [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2012, 29(3): 195-198.
- [3] MIN Q, BAI Y T, YU W, et al. Protective effect and the mechanisms of *Crataegi folium* flavonoids on myocardial ischemia in rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2011, 28(2): 95-99.
- [4] SUN J F. Studies of protective effects and mechanisms of HLF on myocardial ischemia in dogs [D]. Jilin: Univ of Jilin, 2000.
- [5] KUANG R, XUE D, KANG H, et al. Effect of Yexintong capsule on hyperlipidemia in rats [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2005, 22(5): 359-360.
- [6] KANG H, KUANG R. Effects of total flavones of crataegus leaves on experimental atherosclerosis in rabbits [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2009, 26(11): 876-878.
- [7] SCHIEFFER B, SCHIEFFER E, HILFIKER-KLEINER D, et al. Expression of angiotensin II and interleukin-6 in human coronary atherosclerotic plaques potential implications for inflammation and plaque instability [J]. *Circulation*, 2000, 101(12): 1372-1378.
- [8] ZHANG W, LI F, WANG Y Q, et al. Effect of tetrahydroxystilbene-glucoside on lipid and inflammatory factor levels of experimental atherosclerosis in rats [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*(中国临床药理学与治疗学), 2007, 12(5): 516-520.
- [9] HAROKOPAKIS E, HAJISHENGALLIS G. Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor-2, and phosphatidylinositol-3-kinase [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(4): 1201-1210.
- [10] LI L H, LEI H. Effect of celecoxib on the expression cyclooxygenase-2 in atherosclerotic tissues in rabbits [J]. *J China Pharm*(中国药房), 2008, 19(16): 1216-1219.

收稿日期: 2012-06-14