

化痰祛痰方通过调节 ApoE^{-/-} 小鼠胆固醇代谢相关基因表达抗动脉粥样硬化

贾连群, 杨关林, 陈文娜, 李学涛, 杜莹, 曹媛, 赵秋宇

(辽宁中医药大学省部共建中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 辽宁省沈阳市 110847)

[关键词] 化痰祛痰方; 动脉粥样硬化; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 低密度脂蛋白受体; 胆固醇

[摘要] **目的** 观察化痰祛痰方对载脂蛋白 E 基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠粥样斑块以及胆固醇代谢相关基因的影响,探讨化痰祛痰方抗动脉粥样硬化(As)作用及可能的机制。**方法** 10 只 C57BL/6/J 小鼠作为空白对照组,30 只 ApoE^{-/-} 小鼠随机分为模型组、化痰祛痰组[20 g/(kg·d)]和辛伐他汀组[0.005 g/(kg·d)]。全自动生化分析仪检测血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL),HE 染色观察主动脉结构及动脉粥样硬化程度,油红 O 染色观察主动脉脂质沉积,RT-PCR 和 Western blot 检测肝脏低密度脂蛋白受体(LDLR)、卵磷脂胆固醇酰基转移酶(LCAT)及主动脉 CD36 mRNA 和蛋白表达水平,流式细胞术检测腹腔巨噬细胞 CD36 蛋白表达。**结果** 与空白对照组相比,模型组小鼠血清 TC、TG、LDL 水平显著升高;HDL 水平显著降低,主动脉管腔中形成较大粥样斑块,管壁形成大量脂质沉积,肝脏 LDLR、LCAT 基因表达显著下调,主动脉、巨噬细胞 CD36 基因表达显著上调。通过药物干预,与模型组相比,化痰祛痰组和辛伐他汀组小鼠 TC、TG、LDL 水平显著下降,HDL 显著升高,主动脉管腔中粥样斑块面积和管壁脂质沉积量明显减少,肝脏 LDLR、LCAT 基因表达显著上调,主动脉、巨噬细胞 CD36 基因表达显著下调。**结论** 化痰祛痰方可抑制 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块形成,其机制可能与调控血脂及胆固醇代谢相关基因 LDLR、LCAT 及 CD36 的表达有关。

[中图分类号] R2

[文献标识码] A

Effect of Huayuqutan Recipe on Atherosclerosis by Regulating the Expression of Cholesterol Metabolism Related Genes in Apolipoprotein E Gene Knockout Mice

JIA Lian-Qun, YANG Guan-Lin, CHEN Wen-Na, LI Xue-Tao, DU Ying, CAO Yuan, and ZHAO Qiu-Yu

(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, Liaoning 110847, China)

[KEY WORDS] Huayuqutan Recipe; Atherosclerosis; Apolipoprotein E Gene Knockout Mice; Low Density Lipoprotein Receptor; Cholesterol

[ABSTRACT] **Aim** To observe the influence of Huayuqutan recipe on the metabolism of cholesterol in apolipoprotein E gene knockout (ApoE^{-/-}) mice, so as to illuminate the role and mechanism of Huayuqutan recipe on atherosclerosis. **Methods** Ten C57BL/6/J mice were used as blank group. Thirty ApoE^{-/-} mice were randomly divided into model group, Huayuqutan recipe group and simvastatin group. The levels of serum lipid were tested by biochemical methods. HE and oil red staining method were used to observe the aortic wall injury of ApoE^{-/-} mice atherosclerotic mice. RT-PCR and Western blot methods were used to test the changes of expression of low-density lipoprotein receptor (LDLR), lecithin-cholesterol acyl transferase (LCAT) in liver and CD36 in aortic wall. The expression of CD36 in macrophages was detected by flow cytometer. **Results** Compared with the blank group, the serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL) levels and the expression of CD36 in aortic wall and macrophages were significantly increased while high-density lipoprotein cholesterol (HDL) level and expression of LDLR, LCAT in liver were significantly decreased in the model group. In Huayuqutan recipe group and simvastatin group, the serum con

[收稿日期] 2013-08-01

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81202834);沈阳市科技局计划项目(F12-277-1-49);辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划资助项目(LJQ2011100);中国博士后科学基金特别资助项目(201104611)

[作者简介] 贾连群,博士后,研究方向为中医药防治动脉粥样硬化分子生物学机制,E-mail 为 jllq-8@163.com。通讯作者杨关林,教授,博士研究生导师,研究方向为中西医结合防治心血管疾病,E-mail 为 yang_guanlin@163.com。

tent of TG, TC and LDLC were lower and HDLC was higher compared with the model group. At the same time, the expression of LDLR, LCAT in liver were up-regulated and CD36 in aortic wall as well as macrophages was obviously down-regulated.

Conclusion Huayuqutan recipe could inhibit the formation of the atherosclerotic plaques, which might be related to the regulation of blood lipid, the expression of LDLR, LCAT as well as CD36.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是心脑血管疾病的主要病理基础,胆固醇代谢异常是As发生的重要危险因素之一。课题组前期研究发现,化痰祛痰方能显著降低冠心病不稳定型心绞痛患者血浆氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)、甘油三酯(triglyceride, TG)水平,显著升高血清高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)、一氧化氮水平^[1,2],初步提示该药可能通过调节胆固醇代谢进而发挥抗As作用,但是具体机制尚不清楚。本研究通过观察化痰祛痰方对载脂蛋白E基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠粥样斑块以及胆固醇代谢相关基因的影响,探讨化痰祛痰方抗As作用及可能的机制,为该类药物在临床上应用于防治As相关疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

ApoE^{-/-}小鼠,雌雄各半,6~8周龄,体质量18~20 g,共30只。同龄具有相同遗传背景的C57BL/6J小鼠10只。所有动物购自北京大学实验动物中心[SCXK(京)2011-0012],在辽宁中医药大学实验动物中心饲养,SPF级,自由饮水及摄食。

1.2 药物

化痰祛痰方由党参25 g、黄芪25 g、绞股兰15 g、丹参5 g、茯苓10 g、法半夏5 g、石菖蒲5 g、川芎5 g、郁金5 g组成,以上药材均购于辽宁中医药大学附属医院。药材浸泡1 h后,武火煮沸,文火煮20 min,过滤,重复煎3次,合并滤液,制成水煎剂。辛伐他汀片(舒降之),每片20 mg(批号:20091107),由杭州默沙东制药有限公司生产。

1.3 试剂与仪器

油红O购自美国Sigma公司;Trizol、RT-PCR试剂盒、琼脂糖购自大连TaKaRa公司;HE染色液、ApoA、ApoB ELISA试剂盒购自北京鼎国生物技术公司;Bradford蛋白质测定试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;蛋白质提取试剂盒、SABC试剂盒购自武汉博士德公司;兔抗小鼠CD36多克隆

抗体、兔抗小鼠低密度脂蛋白受体(low-density lipoprotein receptor, LDLR)、卵磷脂胆固醇酰基转移酶(lecithin-cholesterol acyl transferase, LCAT)单克隆抗体购自Abcam公司;TG、TC、HDLC及LDLC测定试剂盒购自四川迈新生物技术有限公司。垂直板电泳装置:美国BIO-RAD, Mini-Protein III; DYY 40B型转印电泳槽:北京六一仪器厂产品;荧光显微镜系德国Leica公司产品。

1.4 分组、造模及给药^[3]

30只ApoE^{-/-}小鼠全程给高脂膳食饲料(含脂肪21%,胆固醇0.15%),喂饲8周后随机分为模型组、化痰祛痰组和辛伐他汀组,每组10只。另10只C57BL/6J小鼠作为空白对照。各组处理方式如下:(1)空白对照组:予普通颗粒小鼠饲料,同时给予等量蒸馏水灌胃。(2)模型组:予西方高脂膳食饲料,同时给予等量蒸馏水灌胃。(3)化痰祛痰组:在模型组基础上,给予化痰祛痰方药,含生药20 g/kg体重。(4)辛伐他汀组:在模型组基础上,给予辛伐他汀0.005 g/kg。灌胃给药,每日1次,继续喂养8周取材。实验期间ApoE^{-/-}小鼠死亡2只,最终获取有效实验数据的动物为38只。

1.5 血脂检测

全自动生化分析仪检测血清TG、TC、HDLC和LDLC含量。

1.6 主动脉病理组织形态学观察

取胸主动脉1 cm,甲醛固定,通过逐级脱水、浸蜡、包埋、切片及脱蜡到水,并采用HE染色,在光镜下观察主动脉结构及动脉粥样硬化程度。

1.7 油红O染色观察主动脉脂质沉积

将包埋后的主动脉固定于冰冻切片机上,行厚10 μm的横断面切片,4%多聚甲醛固定5 min,60%异丙醇浸40 s,浸入油红O工作液15 min,60%异丙醇冲洗后蒸馏水冲洗2次,苏木素染色5 min,蒸馏水冲洗2次,1%盐酸酒精分色1 s,封片后在光镜下观察As斑块中脂质沉积。

1.8 RT-PCR定量分析肝脏LDLR、LCAT及主动脉CD36 mRNA水平

引物由大连TaKaRa生物技术公司合成,选用β-actin作为内参照。LDLR上游引物为5'-TC-CATCTTCTTCCCTATTGC-3',下游引物为5'-GC-

CCAGCTTTGCTCTTAT-3'(358 bp);LCAT 上游引物为 5'-GTCTTCCTCATTTGGGCATAG-3',下游引物为 5'-AAAGTCTTGGACGGTGTAGTT-3'(312 bp);CD36 上游引物为 5'-CCTTAA AGGAATCCCCGT GT-3',下游引物为 5'-CCAATGGTCCCAGTCTCATT-3' (418 bp);β-actin 上游引物为 5'-TCCTCCCTG-GAGAAGAGCTA-3',下游引物为 5'- TCAGGAGGAG-CAATGATCTTG-3' (302 bp)。100 mg 组织液氮研磨后加入 1 mL Trizol 裂解,转移至 1.5 mL 离心管中,加入 0.2 mL 氯仿,离心,吸取上层水相,加等量的异丙醇沉淀 RNA,离心,缓慢加入 75% 乙醇洗涤,离心,空气风干后加入 DEPC 水溶解。紫外分光光度计测定 260 nm 及 280 nm OD 值,计算 RNA 的浓度和纯度同时电泳检测。取 0.5 μg RNA 用于 RT-PCR,按照 RT-PCR 试剂盒说明操作,循环参数为 94℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min 进行 30 个循环,72℃ 延伸 10 min 后 4℃ 保存。各组取 10 μL PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,在 Gelpro32 凝胶成像系统上进行分析,以各组目的基因条带与 β-actin 条带密度比值表示相应基因 mRNA 的相对表达水平,实验重复 3 次。

1.9 Western blot 检测肝脏 LDLR、LCAT 及主动脉 CD36 蛋白表达

加入蛋白裂解液提取总蛋白,利用 Bradford 蛋白质测定试剂盒对蛋白进行定量。以 60 μg 蛋白/泳道上样,经 SDS-PAGE 电泳后,电转膜至 PVDF 膜,加入 1:100 兔抗小鼠 LDLR、LCAT 及 CD36 一

抗,4℃ 封闭过夜,TBST 洗涤 3 次,每次 5 min,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:2000)。按试剂盒说明书混合发光液 A 和 B,与膜作用 5 min 后进行 X 光片曝光。X 光片显影和定影后观察结果。

1.10 流式细胞术检测腹腔巨噬细胞 CD36 蛋白表达

采集腹腔巨噬细胞,接种于 6 孔细胞培养板中,37℃、5% CO₂ 培养箱培养过夜。轻轻吸弃培养液后,再用 RPMI1640 完全培养液洗去未贴壁细胞,贴壁细胞即为巨噬细胞。将巨噬细胞转入试管中,用 PBS 洗细胞 2 次,调整细胞浓度为 1 × 10⁶/L,加入 CD36-FITC 抗体,室温孵育 20 min,加 300 μL PBS 重悬细胞后,上流式细胞仪检测。

1.11 统计学分析

全部数据用 SPSS13.0 分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间数据的比较用单因素方差分析(One Way ANOVA)检验差异显著性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血脂变化

与空白对照组相比,模型组 ApoE^{-/-} 小鼠血清 TG、TC、LDLC 水平显著升高(均 $P < 0.01$),HDLc 水平显著降低($P < 0.01$)。与模型组相比,化痰祛痰组和辛伐他汀组 TG、TC、LDLC 水平显著降低(均 $P < 0.01$),而 HDLC 水平显著升高($P < 0.05$;表 1)。

表 1. 血清 TG、TC、HDLc 和 LDLc 含量变化($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1. The content of serum TG, TC, HDLC and LDLC

分 组	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDLc (mmol/L)	LDLC (mmol/L)
空白对照组	1.04 ± 0.08	2.19 ± 0.41	0.97 ± 0.19	0.61 ± 0.23
模型组	3.76 ± 1.25 ^a	19.31 ± 3.66 ^a	0.61 ± 0.15 ^a	2.48 ± 0.52 ^a
化痰祛痰组	1.68 ± 0.39 ^c	9.73 ± 2.16 ^c	0.84 ± 0.20 ^b	1.13 ± 0.45 ^c
辛伐他汀组	1.62 ± 0.45 ^c	7.27 ± 4.34 ^c	0.81 ± 0.21 ^b	1.05 ± 0.38 ^c

a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

2.2 主动脉病理形态学改变及油红 O 染色结果

空白对照组小鼠主动脉管腔中未见粥样斑块,模型组小鼠主动脉管腔中形成较大粥样斑块,化痰祛痰组和辛伐他汀组小鼠主动脉管腔中粥样斑块面积明显减小。油红 O 染色结果发现,空白对照组小鼠主动脉管壁仅见少量脂质沉积,模型组小鼠主动脉管壁形成大量脂质沉积,化痰祛痰组和辛伐他

汀组小鼠主动脉管壁脂质沉积量明显减少(图 1)。

2.3 小鼠肝脏 LDLR、LCAT 及主动脉 CD36 mRNA 表达

与空白对照组相比,模型组小鼠肝脏 LDLR 和 LCAT mRNA 水平显著降低(均 $P < 0.01$),主动脉 CD36 mRNA 水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,化痰祛痰组和辛伐他汀组小鼠肝脏 LDLR 和

LCAT mRNA 水平显著升高,主动脉 CD36 mRNA 水平显著降低($P < 0.05$ 和 0.01 ;图 2)。

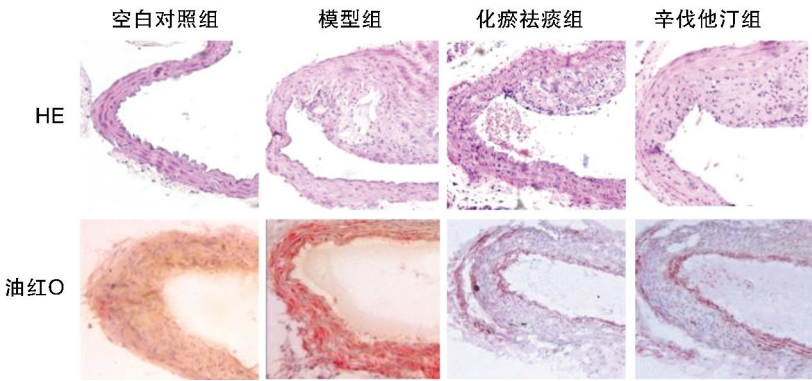


图 1. 小鼠主动脉病理形态学改变及油红 O 染色结果(200 ×)

Figure 1. The HE and oil red staining result in aortic wall

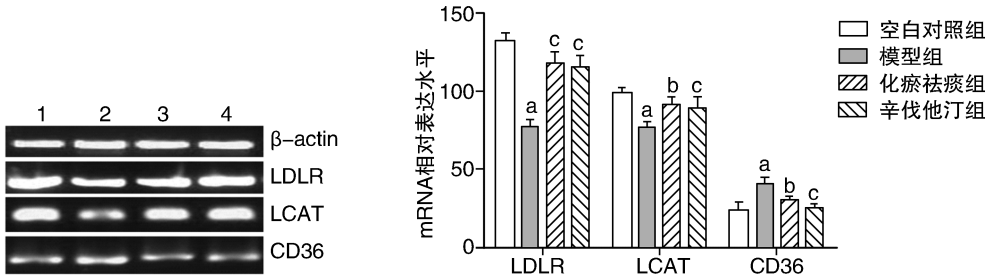


图 2. 小鼠肝脏 LDLR、LCAT 及主动脉 CD36 mRNA 表达 1 为空白对照组,2 为模型组,3 为化痰祛痰组,4 为辛伐他汀组。a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

Figure 2. The mRNA levels of LDLR, LCAT in liver and CD36 in aortic wall

2.4 小鼠肝脏 LDLR、LCAT 及主动脉 CD36 蛋白的表达

与空白对照组相比,模型组小鼠肝脏 LDLR 和 LCAT 蛋白水平显著降低(均 $P < 0.01$),主动脉

CD36 蛋白水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组相比,化痰祛痰组和辛伐他汀组小鼠肝脏 LDLR 和 LCAT 蛋白显著升高,主动脉 CD36 蛋白水平显著降低($P < 0.05$ 和 0.01 ;图 3)。

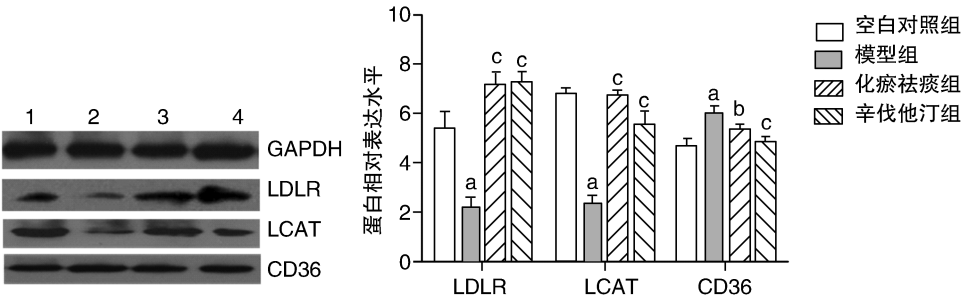


图 3. 小鼠肝脏 LDLR、LCAT 及主动脉 CD36 蛋白表达 1 为空白对照组,2 为模型组,3 为化痰祛痰组,4 为辛伐他汀组。a 为 $P < 0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

Figure 3. The protein levels of LDLR, LCAT in liver and CD36 in aortic wall

2.5 腹腔巨噬细胞 CD36 蛋白表达

与空白对照组相比,模型组小鼠腹腔巨噬细胞 CD36 蛋白水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组相

比,化痰祛痰组和辛伐他汀组小鼠腹腔巨噬细胞 CD36 蛋白水平显著降低(均 $P < 0.01$;图 4)。

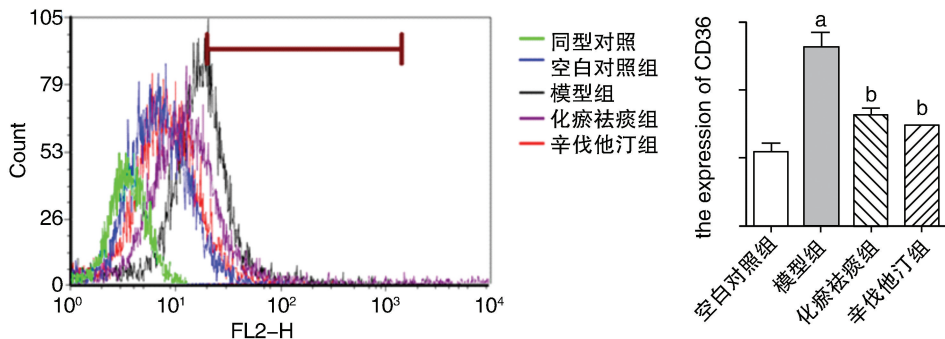


图 4. 小鼠腹腔巨噬细胞 CD36 蛋白表达 a 为 $P < 0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。
Figure 4. The protein level of CD36 in macrophages

3 讨论

As 是一种多因素、多环节的疾病,其基本病变主要在于脂质浸润、内皮损伤和炎症反应等方面。ApoE^{-/-}小鼠由美国洛克菲勒大学生化遗传与代谢实验室、北卡罗莱那大学病理遗传实验室应用基因同源重组的靶基因技术联合培育成功。ApoE 基因变异或基因敲除后,血浆中富含胆固醇的残粒清除障碍,当喂以该小鼠普通饲料时,即可出现高胆固醇血症,并自发地形成纤维斑块和复合斑块。当喂以西方高脂膳食饲料(高脂、高胆固醇膳食),则病变程度加剧。该小鼠形成的斑块特点与人类 As 斑块极为相似,是进行 As 发病机制和防治研究较为理想的动物模型。

本研究结果发现,与空白对照组相比,模型组小鼠血清 TC、TG、LDLC 水平显著升高;HDLc 水平显著降低,主动脉管腔中形成较大粥样斑块,管壁形成大量脂质沉积。上述结果表明,本研究选用造模方法较为成功。对胆固醇代谢相关基因的研究表明,与空白对照组比较,模型组小鼠肝脏 LDLR、LCAT 基因表达显著下调,主动脉、巨噬细胞 CD36 基因表达显著上调,提示 ApoE^{-/-} As 模型小鼠存在胆固醇代谢相关基因表达紊乱。

胆固醇水平升高是导致 As 性相关疾病发生的独立危险因素,巨噬细胞内胆固醇的聚集和细胞泡沫化在 As 形成过程中始终起着主要作用。人类血清中 70% 的胆固醇由 LDL 和 VLDL 携带,循环中约 75% LDL 在肝脏清除,其中 90% 是通过 LDLR 途径清除^[4]。LDLR 是一种跨膜糖蛋白,位于细胞表面被膜凹的浆膜部位,广泛分布肝细胞、血管平滑肌细胞、成纤维细胞、淋巴细胞、单核细胞及肾上腺、卵巢等,通过介导细胞摄取 LDLc,增加 LDLc 的降解,对于血浆 LDLc 维持于相对恒定水平具有重要

作用。LCAT 催化 HDLC 的胆固醇 3 位羟基接受卵磷脂 2 位酰基后酯化而生成胆固醇酯,体内绝大部分胆固醇经过这一步骤后才能被转运到肝脏进一步分解代谢。LCAT 表达减少或结构异常导致具有拮抗 As 作用的 HDLC 水平下降,外周组织以及 LDL 和 VLDL 中过剩的游离胆固醇水平升高,As 易感性增加^[5]。清道夫受体 CD36 抗原广泛存在于多种不同种类的细胞,如单核细胞/巨噬细胞、血管内皮细胞、脂肪细胞等。单核巨噬细胞表面 CD36 可识别和内吞 ox-LDL,诱导细胞泡沫化,从而导致 As 发生、发展。研究表明 CD36 在巨噬细胞上可以无限限制地摄取 ox-LDL(即不受负反馈抑制),巨噬细胞通过 CD36 受体途径摄取的 ox-LDL 占总摄取量的 40%^[6,7]。

动脉粥样硬化症在古籍中无明确病名,根据受累部位不同以及所出现的各种症状可归属于“眩晕”、“头痛”、“健忘”、“痴呆”、“中风”、“胸痹”、“真心痛”、“脉痹”、“脱疽”等多种病症范畴。近年来学术界普遍认为其发病机制主要与痰、瘀、虚相关。研究所选用的化痰祛痰方具有健脾益气、化痰祛瘀之功效,主治疗浊血瘀型 As 患者,临床取得可喜疗效,并已经获得国家发明专利(ZL200710010845.9)。

研究发现通过药物干预,与模型组相比,化痰祛痰组 ApoE^{-/-}小鼠血清 TC、TG、LDLC 水平显著下降,HDLc 水平显著升高,小鼠主动脉管腔中粥样斑块面积和管壁脂质沉积量明显减少,提示化痰祛痰方可通过控制血脂水平发挥抗动脉粥样硬化作用。同时,与模型组相比,小鼠肝脏 LDLR、LCAT 基因表达显著上调,主动脉、巨噬细胞 CD36 基因表达显著下调。肝脏细胞对游离胆固醇摄取能力主要取决于膜表面 LDLR 的数量及其活性,LDLR 表达显著上调,促进胆固醇内吞进入肝脏代谢转化,降低

血清胆固醇水平^[8]。升高的 LCAT 含量可进一步通过促进细胞膜上的胆固醇转移至 HDL、新生 HDL 向成熟大颗粒 HDL 亚类转变、清除 LDL 和 VLDL 颗粒中过剩 CE 等作用发挥抗 As 作用。同时,主动脉和巨噬细胞 CD36 水平降低减少了外周细胞胆固醇的摄取,有效抑制泡沫细胞的形成。

综上所述,化痰祛痰方可抑制 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块形成,其机制可能与调控血脂及胆固醇代谢相关因子 LDLR、LCAT 及 CD36 基因表达有关,值得深入探讨。

[参考文献]

[1] 杨关林,王宇宏,刘君.化痰祛痰颗粒剂对UAP血浆Ps PAI-1 C-RP血清NO及血脂的影响[J].辽宁中医杂志,2003,30(8):630-631.

[2] 王健,杨关林.化痰祛痰颗粒剂对冠心病患者血管内皮功能的影响[J].辽宁中医杂志,2005,32(5):430-432.

[3] 章怡祎,刘萍,励冬斐.冠心康对ApoE基因敲除小鼠

动脉粥样硬化的影响[J].上海中医药杂志,2012,46(11):80-83.

[4] Ohgami N, Nagai R, Miyazaki A, et al. Scavenger receptor class B type I mediated reverse cholesterol transport is inhibited by advanced glycation end products[J]. Biol Chem, 2001, 276: 13 348-355.

[5] BrousseauME, Kauffman RD, Herderick EE, et al. LCAT modulates atherogenic plasma lipoproteins and the extent of atherosclerosis only in the presence of normal LDL receptor in transgenic rabbits[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20 (2): 450-458.

[6] Nicholson AC. Expression of CD36 in macrophage and atherosclerosis. The role of lipid regulation of PPAR γ signaling[J]. Trends Cardiovasc Med, 2004, 14: 8-12.

[7] 靳文英,陈红. CD36与动脉粥样硬化[J].中国动脉硬化杂志,2010,18(7):582-585.

[8] 欧海龙,严忠海,雷霆雯. LDLR^{-/-}小鼠中脂代谢相关基因的表达[J].中国动脉硬化杂志,2012,20(12):1 088-092.

(此文编辑 许雪梅)