

大黄素对高脂饲料诱导 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的影响

夏 丽¹, 田维毅^{1*}, 王和生^{1*}, 李妹娟¹, 张 磊¹, 赖陈岑²
(1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550000; 2. 贵州中医药大学第一附属医院, 贵州 贵阳 550000)

摘要: **目的** 观察大黄素对高脂饲料诱导的 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化中 MCP-1 及 IFN- γ 的影响。**方法** 60 只雄性 ApoE^{-/-} 小鼠分为模型组, 大黄素高、中、低剂量组和阳性对照组, 给予高脂饲料, 并隔 1 d 腹部皮下注射脂多糖, 正常对照组为 C57BL/6 J 小鼠, 给予普通饲料和注射生理盐水。第 10 周起, 基于高脂饮食, 大黄素高、中、低剂量组分别灌胃 40、20、10 mg/kg 大黄素, 阳性对照组灌胃 200 mg/kg 血脂康, 正常对照组给予普通饲料和灌胃生理盐水, 持续给药 6 周后, 取血清及心肌组织。用全自动酶标仪检测 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平, RT-qPCR 检测心肌组织 MCP-1、IFN- γ mRNA 表达, ELISA 检测 MCP-1、IFN- γ 水平。**结果** 与正常对照组比较, 模型组血清 TC、TG、LDL-C、MCP-1 水平升高 ($P<0.05$), HDL-C、IFN- γ 水平降低 ($P<0.05$), 心肌组织 MCP-1 mRNA 表达升高 ($P<0.05$), IFN- γ mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 与模型组比较, 大黄各剂量组和阳性对照组血清 TC、TG、LDL-C、MCP-1 水平均降低 ($P<0.01$), HDL-C、IFN- γ 水平均升高 ($P<0.01$), 心肌组织 MCP-1 mRNA 表达降低 ($P<0.01$), IFN- γ mRNA 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化模型的病变有显著影响, 其可能是通过调控 MCP-1、IFN- γ 的表达抑制炎症反应, 调节脂类代谢, 从而发挥抗动脉粥样硬化的作用。

关键词: 大黄素; 动脉粥样硬化; 炎症

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)12-3464-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.12.039

近年来, 心血管疾病的发生及死亡呈日益年轻化、增长化趋势, 作为其重要病理基础, 动脉粥样硬化的预防与治疗已成为重点研究对象。作为一种慢性炎症疾病, 从血管内脂质条纹产生到纤维斑块, 再进展为动脉粥样斑块, 到斑块不稳定和破裂, 炎症反应贯穿于动脉粥样硬化发生发展的全过程^[1], 始终都能检测到各种炎症细胞和炎症介质, 例如巨噬细胞和白细胞介素等炎症因子。经研究发现, 制首乌中的大黄素具有抗心肌缺血、抗动脉粥样硬化、降低血脂的作用^[2]。本研究旨在研究大黄素对单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、干扰素 γ (interferon gamma, IFN- γ) 的影响, 为今后防治动脉粥样硬化提供理论依据。

1 材料

1.1 动物与饲料 雄性 SPF 级 C57BL/6 J 小鼠 12 只, ApoE^{-/-} 小鼠 60 只, 6 周龄, 体质量 (20 $\pm$ 2) g, 购自贵州医科大学, 实验动物生产许可证号 SCXK (黔) 2012-0001, 实验操作符合伦理委员会要求。高脂饮食按照 21% 精炼猪油、0.15% 胆固醇、78.85% 基础饲料比例制作^[3]。

1.2 药物、试剂与仪器 大黄素 (黄色粉末, 纯度 98.7%, 货号 BH20150716, 西安飞达生物技术有限公司);

收稿日期: 2020-01-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81760790, 81460670)

作者简介: 夏 丽 (1994—), 女, 硕士, 从事中医药调节高脂血症及抗动脉粥样硬化作用机制研究。E-mail: xiali945@163.com

* 通信作者: 田维毅 (1972—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医药防治动脉粥样硬化研究。E-mail: tianweiyi@gzy.edu.cn

王和生 (1955—), 女, 教授, 硕士生导师, 从事中医药调节高脂血症及抗动脉粥样硬化作用机制研究。E-mail: 1452665049@qq.com

血脂康 (批号 Z10950029, 北京北大维信生物科技有限公司)。小鼠 MCP-1 ELISA 试剂盒 (货号 EMC113)、小鼠 IFN- γ ELISA 试剂盒 (货号 EMC101) 均购自欣博盛生物科技有限公司; 脂多糖 (货号 L2880, 美国 Sigma 公司)。实时荧光定量 PCR 仪 (型号 CFX96)、微电脑 PCR 仪 (型号 C1000) 均购自美国 Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 动物模型建立及给药 将 60 只成年雄性 ApoE^{-/-} 小鼠普通饲料喂养 1 周, 随机分为模型组, 大黄素高、中、低剂量组, 阳性对照组, 每组 12 只。正常对照组为 ApoE^{-/-} 小鼠的背景鼠 C57BL/6 J 成年小鼠, 健康雄性, 共 12 只, 以基础饲料常规饲养, 灌胃生理盐水; 给药组小鼠基于高脂饮食, 大黄素高、中、低剂量组分别灌胃 40、20、10 mg/kg 药物, 阳性对照组灌胃 200 mg/kg 血脂康, 连续 6 周。

2.2 血液、心肌组织采集 给药 6 周后隔 1 d, 小鼠禁食 12 h, 眼球取血, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清用于生化及 ELISA 检测, 取小鼠心脏并纵向剪开, 得到的心肌组织放入 RNA 保存液用于提取 RNA。

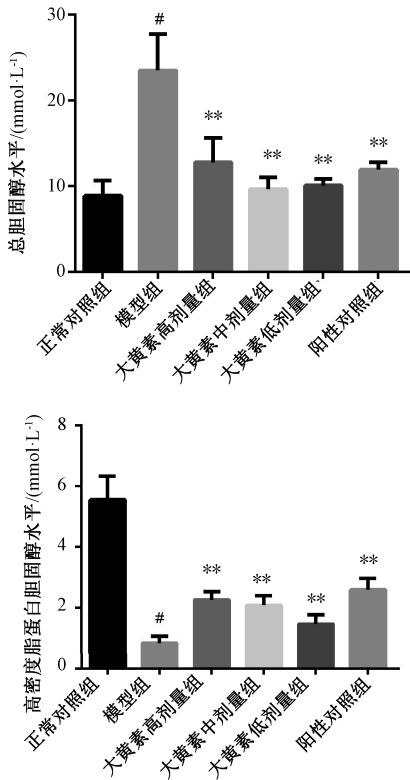
2.3 生化指标检测 通过全自动酶标仪检测总胆固醇

(total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平。

2.4 RT-qPCR 检测小鼠心肌组织 MCP-1、IFN-γ mRNA 表达 按说明书提取心肌组织 RNA, 根据试剂盒说明书, 冰上配制各组反应液, 进行 RT-qPCR 分析, 反应条件为预变性 50 ℃, 120 s; 95 ℃, 600 s; 热循环, 95 ℃, 15 s; 退火 60 ℃, 60 s, 40 次循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物序列 (5'→3')	扩增长度/bp
IFN-γ	正向 CCACGCGACAGTCATTGAAAG	200
	反向 TGCTGATGGCCTGATTGTCTT	
MCP-1	正向 ACCTGCTGCTACTCATTACCC	149
	反向 CATTCTCTCTTGGGGTCAGCA	
β-actin	正向 GTGCTATGTGCTCTAGACTTCG	147
	反向 ATGCCACAGGATCCATACC	



注: 与正常对照组比较, #*P*<0.05; 与模型组比较, ***P*<0.01。

图 1 各组小鼠血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平

3.2 各组小鼠心肌组织 MCP-1、IFN-γ 的 mRNA 表达 与正常对照组比较, 模型组 MCP-1 mRNA 表达升高 (*P*<0.05), IFN-γ mRNA 表达降低 (*P*<0.05); 与模型组比较, 大黄素各剂量组和阳性对照组 MCP-1 mRNA 表达降低 (*P*<0.01), IFN-γ mRNA 表达升高 (*P*<0.05, *P*<0.01), 见图 2。

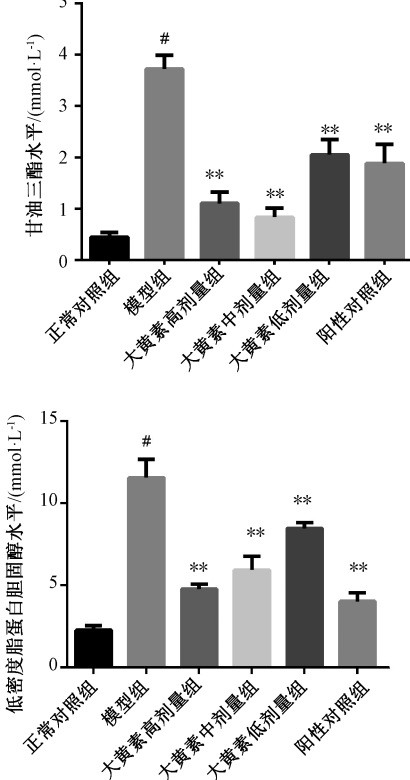
3.3 各组小鼠血清 MCP-1、IFN-γ 水平 与正常对照组比

2.5 ELISA 法检测血清 IFN-γ、MCP-1 水平 于对照组孔内滴加梯度浓度对照品, 样品孔内滴加待测样品, 37 ℃ 水浴锅孵育 90 min, 洗板 5 次, 甩净, 于空白孔中滴加抗体稀释液, 其余孔中滴加抗体工作液, 37 ℃ 水浴锅孵育 60 min, 洗板 5 次, 甩净, 空白孔加酶结合物稀释液, 其余孔加酶结合物工作液, 37 ℃ 水浴锅孵育 30 min, 洗板 5 次, 每孔滴加显色底物液, 封板胶覆盖反应孔, 37 ℃ 水浴锅孵育 15 min, 每孔滴加终止液后, 置于酶标仪内, 检测吸光度。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 16.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

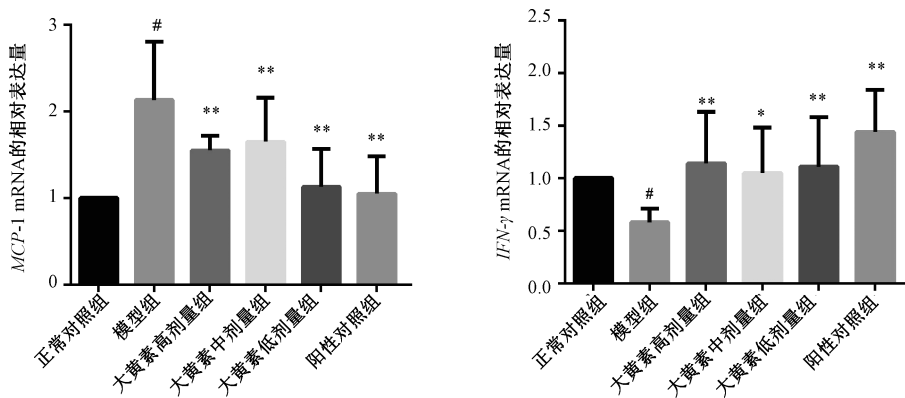
3.1 各组小鼠血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平变化 与正常对照组比较, 模型组血清 TC、TG、LDL-C 水平升高 (*P*<0.05), HDL-C 水平降低 (*P*<0.05); 与模型组比较, 大黄素各剂量组和阳性对照组 TC、TG、LDL-C 水平均降低 (*P*<0.01), HDL-C 水平均升高 (*P*<0.01), 见图 1。



较, 模型组 MCP-1 水平升高 (*P*<0.05), IFN-γ 水平减低 (*P*<0.05); 与模型组比较, 大黄素低、中剂量组和阳性对照组血清 MCP-1 水平降低 (*P*<0.01), IFN-γ 水平升高 (*P*<0.01), 大黄素高剂量组血清 MCP-1、IFN-γ 水平均降低 (*P*<0.01), 见图 3。

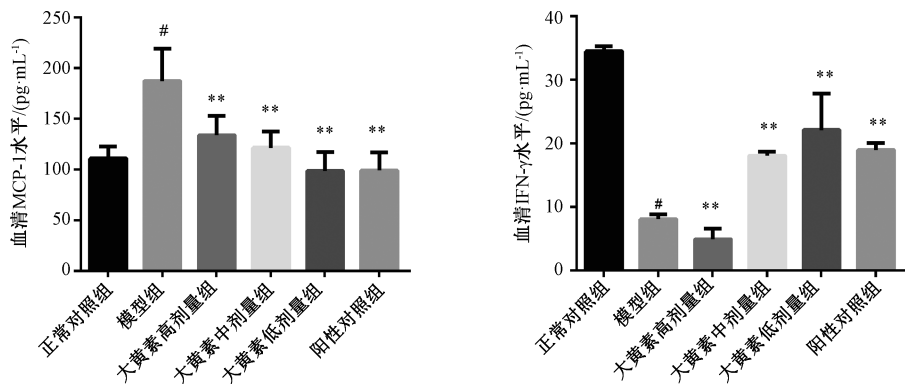
4 讨论

动脉粥样硬化作为心脑血管疾病的病理基础, 主要涉



注：与正常对照组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{*}*P*<0.05，^{**}*P*<0.01。

图 2 各组小鼠心肌组织 MCP-1、IFN-γ mRNA 表达



注：与正常对照组比较，[#]*P*<0.05；与模型组比较，^{**}*P*<0.01。

图 3 各组小鼠血清 MCP-1、IFN-γ 水平

及脂类代谢、炎症与氧化应激等。上世纪 90 年代动脉粥样硬化的炎症理论提出后^[4]，逐渐被世界广泛接受。血脂与动脉粥样硬化之间关系已是众所周知，现在大多数认可，TC、TG、LDL-C 的发展诱导动脉粥样硬化，尤其 ox-LDL 刺激泡沫细胞生成从而释放出更多的炎症介质加重，而 HDL-C 则是帮助减少其发生发展^[5]。MCP-1 是巨噬细胞分泌的促炎症因子，是加速形成动脉粥样硬化的重要因素之一。临床研究发现，患有动脉粥样硬化内膜斑块的患者，体内血清 MCP-1 的水平高于正常组^[6]。既往研究表明，MCP-1 不仅可以趋使单核细胞聚集，加速泡沫细胞形成，还可以对白介素、肿瘤坏死因子等其余促炎症因子产生影响，促进血管内皮细胞的增殖，加速动脉粥样硬化斑块形成^[7-8]。IFN-γ 曾用名巨噬细胞活化因子，为水溶性二聚体，是 II 型干扰素。研究发现，ApoE^{-/-}小鼠建模成功后主动脉壁斑块免疫组化中可见 IFN-γ 呈现阳性，表达高于正常组^[9]。IFN-γ 是双向调节因子，在动脉粥样硬化发生发展过程中扮演重要角色。另有学者报道通过调控 IFN-γ 可以改善动脉粥样硬化的病变程度^[10]，在巨噬细胞中抑制极低密度脂蛋白受体表达，抑制泡沫细胞形成^[11]。

大黄素作为制首乌游离蒽醌主要成分，具有抗炎、抗氧化、降低血脂等作用。本课题组前期研究发现，制首乌游离蒽醌抗动脉粥样硬化作用可能通过上调 ABCA1，调控

血脂，影响血清 NO 水平，降低 NF-κB、IL-1β 表达抑制炎症反应^[12-14]。本研究结果显示，模型组 TC、TG、LDL-C 水平较正常对照组升高，提示动脉粥样硬化模型复制成功；与模型组比较，大黄素各剂量组和阳性对照组 TC、TG、LDL-C 均有不同程度的下降，提示大黄素可以加速 TC、TG、LDL-C 的分解，促进血清中 HDL-C 的合成，起到有良好的调脂作用。从基因表达上看，本研究模型组中 MCP-1 mRNA 表达升高，IFN-γ mRNA 表达降低，这与文献报道一致，进一步说明 MCP-1 伴随着动脉粥样硬化的发展。通过大黄素干预后，MCP-1 mRNA 表达降低，IFN-γ mRNA 表达升高，提示大黄素可以降低 MCP-1、升高 IFN-γ mRNA 表达，抑制炎症反应。ELISA 检测 MCP-1 水平变化趋势与基因表达基本一致。大黄素中、低剂量干预后 IFN-γ 水平升高，而高剂量组表现不同，考虑是大黄素高剂量组在转录过程中能升高 IFN-γ 的表达，但其翻译修饰等各种因素出现蛋白变化，具体表现差异有待进一步研究。

综上所述，本研究以 ApoE^{-/-}小鼠为对象，炎症与动脉粥样硬化的关系为切入点，观察大黄素对炎症因子 MCP-1、IFN-γ 的影响。结果表明，大黄素可以通过调控 MCP-1、IFN-γ 抑制动脉粥样硬化的炎症反应，具有抗炎及抗动脉粥样硬化的作用，为临床防治动脉粥样硬化及药物的开发提供了新思路。

参考文献:

[1] 谭宇卫, 郑玉姣, 王雅君, 等. 血脂异常及动脉粥样硬化中医研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(16): 3197-3200.

[2] 刘 静, 王 丽. 大黄素的研究进展[J]. 中国药房, 2014, 25(35): 3351-3354.

[3] 王通渤. 基于 JAK2/STAT3 通路研究制首乌有效成分大黄素抗动脉粥样硬化的作用机制[D]. 贵阳: 贵阳中医学院, 2017.

[4] Ross R. Atherosclerosis——an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.

[5] Steinberg D, Glass C K, Witztum J L. Evidence mandating earlier and more aggressive treatment of hypercholesterolemia [J]. *Circulation*, 2008, 118(6): 672-677.

[6] 梁洁玲, 王洋洋, 司艳辉, 等. MCP-1 水平与颈动脉粥样硬化程度的相关性研究[J]. 黑龙江医学, 2015, 39(5): 475-476.

[7] Shao L, Zhang P, Zhang Y, *et al.* TLR3 and TLR4 as potential clinically biomarkers of cardiovascular risk in coronary artery disease (CAD) patients[J]. *Heart Vessels*, 2014, 29(5): 690-698.

[8] Clahsen T, Schaper F. Interleukin-6 acts in the fashion of a classicalchemokine on monocytic cells by inducing integrin activation, cell adhesion, actin polymerization, chemotaxis, and transmigration [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84 (6): 1521-1529.

[9] 熊晓亮. 动脉粥样硬化的口服免疫耐受及细胞因子检测 [D]. 长春: 吉林大学, 2011.

[10] 朱晓刚, 王丽岳, 王丽江, 等. 缬沙坦改善小鼠动脉粥样硬化的作用机制研究[J]. 基因组学与应用生物学, 2018, 37(5): 2312-2319.

[11] Kosaka S, Takahashi S, Masamura K, *et al.* Evidence of macrophage foam cell formation by very low-density lipoprotein receptor; interferon- γ inhibition of very low-density lipoprotein receptor expression and foam cell formation in macrophages[J]. *Circulation*, 2001, 103(8): 1142-1147.

[12] 赖陈岑, 王和生, 赵建雄, 等. 制首乌提取物对兔动脉粥样硬化模型中 ABCA1 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(6): 87-89.

[13] 冷传龙, 王和生, 王永萍, 等. 制首乌总游离蒽醌对 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化模型肝脏、脂肪组织重量及血脂、血清 NO 的影响[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(8): 1806-1807.

[14] 夏 丽, 王和生, 冷传龙, 等. 制首乌中大黄素对泡沫细胞 NF- κ B、TNF- α 及 IL-1 β 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(3): 532-533.

补肾疏肝方对老年抑郁症大鼠血清炎症因子和海马神经递质的影响

揭会贤¹, 李 显¹, 杨振博¹, 姚建平^{1*}, 封银曼²
(1. 河南中医药大学基础医学院, 河南 郑州 450046; 2. 郑州卫生健康职业学院, 河南 荥阳 450100)

摘要: **目的** 观察补肾疏肝方对老年抑郁症模型大鼠血清炎症细胞因子和海马单胺类神经递质的影响, 探索衰老的机制及补肾疏肝方抗老年抑郁症的作用机理。 **方法** SD 雄性大鼠随机分为空白对照组、老年抑郁症模型组、补肾疏肝方组及盐酸氟西汀组, 共 4 组。4 组大鼠均自然喂养至 16 月龄。自 16 月龄始, 除空白对照组外, 其余 3 组大鼠采用轻度慢性不可预见性应激的方法复制抑郁症模型。补肾疏肝方组和盐酸氟西汀组分别灌胃补肾疏肝方药液 14.6 g/kg 和盐酸氟西汀药液 1.8 mg/kg。空白对照组和老年抑郁症模型组大鼠分别灌胃等容量生理盐水, 共 21 d。采用旷场实验进行大鼠行为学观察, 运用酶联免疫法检测各组大鼠血清炎症细胞因子 IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10 和 TNF- α 水平, 高效液相电化学法检测各组大鼠海马单胺类神经递质 DA、NE 和 5-HT 水平。 **结果** 造模前各组大鼠旷场实验评分无显著差异 ($P>0.05$)。造模后, 与空白对照组比较, 老年抑郁症模型组大鼠水平得分和垂直得分均显著降低 ($P<0.01$); 血清 IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 水平均升高, IL-4、IL-10 水平均降低, 海马组织 NE、DA 和 5-HT 水平下降 ($P<0.01$)。与老年抑郁症模型组比较, 补肾疏肝方组和盐酸氟西汀组大鼠水平得分和垂直得分均升高 ($P<0.01$); 血清 IL-6、IL-8、TNF- α 水平均降低 ($P<0.01$), IL-4、IL-10 水平均升高 ($P<0.01$), 补肾疏肝方大鼠血清 IL-1 水平

收稿日期: 2020-06-01
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81273656); 河南省高等学校重点科研项目 (18A360003)
作者简介: 揭会贤 (1993—), 男, 硕士, 从事方剂配伍及中医药延缓衰老研究。Tel: 13949111679; E-mail: 1194279823@qq.com
* 通信作者: 姚建平 (1974—), 男, 博士, 教授, 从事方剂配伍及中医药延缓衰老研究。Tel: 15936298812; E-mail: yjp740719@163.com
网络出版日期: 2020-12-25
网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20201225.1502.004.html>