

马黛通络饮对 APOE 基因敲除小鼠脂质代谢的影响

于少泓

【摘要】 目的 观察马黛通络饮对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠脂质代谢的作用机制。**方法** 64 只 5 周龄 ApoE^{-/-}小鼠高脂饲料喂养,马黛通络饮灌胃干预 8 周后,检测小鼠血脂含量及主动脉的酯酰辅酶 A-胆固醇酰基转移酶 1 (acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferases1, ACAT1)、氧化低密度脂蛋白的内皮受体(lectin-like OX-LDL receptor 1, LOX-1)的蛋白表达。**结果** 模型组血液中的总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)浓度明显高于正常组。与模型组相比较,马黛通络饮高剂量组明显降低血清 TC、TG、LDL-C 水平及主动脉组织中的 ACAT1、LOX-1 的表达,明显升高血清高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)水平($P < 0.05$),低剂量组对 TG、LDL-C、HDL-C 的作用效果显著($P < 0.05$),而对 TC 及 ACAT1、LOX-1 作用效果不明显($P > 0.05$)。**结论** 马黛通络饮能降低 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平,抑制 ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织中的 ACAT1、LOX-1 的表达,通过调节血脂异常和脂质沉积发挥其阻止动脉粥样硬化及心脑血管疾病发生和发展的作用。

【关键词】 马黛通络饮; 血脂; 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠; 动脉粥样硬化; 脂质代谢

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.09.006

Effects of Madai Tongluo decoction on lipid metabolism in apolipoprotein E-deficient mice YU Shaohong. Rehabilitation College, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Corresponding author: YU Shaohong, E-mail: sutcm2006@163.com

【Abstract】 Objective To study the effect mechanism of Madai Tongluo decoction on vascular endothelial injury of atherosclerosis in apolipoprotein e-knockout mice. **Methods** Five-week-old male ApoE^{-/-} mice were fed with a high fat high cholesterol diet. 8 weeks after the intervention of Madai Tongluo decoction. The level of serum lipid and the expression of acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferases1 (ACAT1)、Lectin-like OX-LDL receptor 1 (LOX-1) was detected. **Results** Serum contents of TC, TG and LDL-C in the Model group were significantly higher than that in normal group. Serum contents of TC, TG, LDL-C and the ACAT1、LOX-1 of aortic tissue in Madai Tongluo decoction high-dose group were significantly lower than those in model group ($P < 0.05$), and serum HDL-C in Madai Tongluo decoction high-dose group was significantly lower than that in model group. TG、LDL-C、HDL-C and LOX-1 in Madai Tongluo decoction low-dose group were significant improved ($P < 0.05$), but TC and ACAT1 were non-significant ($P > 0.05$). **Conclusions** Madai Tongluo decoction can regulate lipid metabolism of ApoE^{-/-} mice and inhibit ACAT1 and LOX-1 expression of aortic tissue. Madai Tongluo decoction can inhibit the occurrence and development of atherosclerotic lesions, cardiovascular and cerebrovascular diseases, the possible mechanisms may be associated with lipid metabolism and inhibition of lipid deposition.

基金项目: 山东省高等学校科技计划(J16LK09); 山东省中医药科技发展计划(2011-022); 国家科技部国际合作项目(2010-016)

作者单位: 250355 济南, 山东中医药大学康复学院

作者简介: 于少泓(1975-), 博士, 副教授。研究方向: 心脑血管疾病的康复研究。E-mail: sutcm2006@163.com

【Key words】 *Madai Tongluo* decoction; Blood lipid; ApoE $-/-$ mice; Atherosclerosis; Lipid metabolism

脂质代谢紊乱是导致动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的主要机制,是心脑血管疾病发病的重要原因。既往研究表明南美马黛草具有降脂、促进微循环、抗炎等作用^[1-7],因其功效符合中药化痰活血的特点,笔者以马黛草为君药,在血府逐瘀汤的基础上进行加减,形成马黛通络饮,从活血化瘀的角度探讨其对载脂蛋白 E (ApoE) 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化血脂代谢的影响,并探讨可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

5 周龄雄性 ApoE 基因敲除小鼠 64 只,体质量 17~18 g,同遗传背景 C57BL/6J 小鼠雄性 12 只,体质量 21~23 g,均由南京大学模式动物研究所提供,动物质量许可证分别为 SCXK(苏)2015-0001、SCXK(苏)2014-0037。

1.2 实验药物与试剂

马黛通络饮方药组成为:马黛 20 g、黄芪 15 g、石菖蒲 15 g、桃仁 12 g、红花 9 g、当归 9 g、枳壳 6 g、赤芍 6 g、川芎 6 g、桔梗 6 g、柴胡 3 g、甘草 3 g,按常规方法煎煮、过滤、浓缩,制成每毫升含生药 1 g 的浓缩液。其中,马黛草购自阿根廷 Molienda Company,中华人民共和国出入境检验检疫卫生证书编号:370200112023716,其余中药购自建联中药店。辛伐他汀片:20 mg/片,批号 H20084420,山东鑫齐药业;总胆固醇 (total cholesterol, TC) 试剂盒、甘油三酯 (triglyceride, TG) 试剂盒、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 试剂盒、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;氧化低密度脂蛋白的内皮受体 (lectin-like OX-LDL receptor 1, LOX-1) 抗体购自 abcam 公司,酯酰辅酶 A-胆固醇酰基转移酶 1 (acyl-coenzyme A-cholesterol acyltransferases 1, ACAT1) 试剂盒购自美国 R&D 公司。

1.3 实验仪器

光学显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司);成像系统(Tanon 公司);酶标仪(芬兰雷勃酶标仪);洗板机,(芬兰 ThermoLabsystems 公司);电泳仪(BIO-RAD 公司)。

1.4 方法

1.4.1 动物模型的建立和分组 5 周龄 ApoE 基因敲除小鼠及 C57BL/6J 小鼠,饲养室通风和空调设备良好,室温保持 19~21℃,相对湿度 50%~60%,小鼠自由进食饮水。ApoE 基因敲除小鼠适应性饲养 1 周后,给予 0.15% 胆固醇+21% 脂肪+普通鼠料的高脂饲料喂养 4 周,随机分为模型组、辛伐他汀组、马黛通络饮高剂量组、马黛通络饮低剂量组,每组 12 只,继续高脂喂养并给予相应药物灌胃给药干预 8 周取材。另外,选取具有相同遗传背景的 C57BL/6J 小鼠为正常对照组,给予普通饲料喂养。

1.4.2 药物干预方法 将马黛通络饮用蒸馏水配成高、低不同浓度的 0.4 mL 溶液,根据小鼠体重,马黛通络饮高剂量组给予 20 g/(kg·d) 灌胃,马黛通络饮低剂量组给予 5 g/(kg·d) 灌胃,辛伐他汀组给予 0.01 g/(kg·d) 的辛伐他汀稀溶液 0.4 mL 灌胃,模型组及正常对照组给予相同体积(0.4 mL)的生理盐水灌胃,各组均每天灌胃 1 次,12 周后取材。

1.4.3 标本取材 禁食 12 小时,注射戊巴比妥钠处死小鼠,眼球取血 0.8 mL,常温静置分离血清用于血脂检查。其他血液样本被收集在无菌试管内,4℃ 温度下以 3000 rpm 离心 10 分钟,分离血清,以备检测。处死小鼠后,打开胸腔,沿胸椎体前面下降穿过膈的主动脉裂孔进入腹腔。将主动脉紧贴心脏的部分剪断,沿着动脉剥离血管周围的脂肪,最终在膈的主动脉裂孔处剪断,分离出动脉血管,小心剥开血管,刮净血管内壁的脂肪,部分样本置于 4% 多聚甲醛浸泡溶液中固定,备做病理标本。

1.4.4 检测指标及测定方法 小鼠主动脉标本用 OCT 包埋, -80℃ 凝固包埋剂,冰冻切片机制作 6 μm 冰冻切片。将切片进行苏木素-伊红 (Hematoxylin-Eosin, HE) 染色,中性树脂封片,吹干,400 倍镜下观察斑块组织学特点并拍照。按照试剂盒方法测定小鼠血清中 TG、TC、HDL-C、LDL-C 的含量。其中,小鼠血清中 TG 含量通过酶法测定;TC 的含量通过酶偶联比色法检测;LDL-C 的含量采用直接法检测;HDL-C 的含量选择性沉淀法检测。ELISA 方法检测小鼠主动脉组织中 ACAT1, Western blot 检测各组小鼠主动脉组织中 LOX-1 的蛋白表达。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件包 (IBM, Chicago,

USA) 进行分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间比较采用方差分析中的 LSD 分析。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠主动脉组织形态分析

正常对照组光镜可见主动脉管腔正常, 内皮细胞连续完整, 内膜光滑无增厚, 未见泡沫细胞和脂质沉积; 模型组的主动脉管腔有狭窄处, 内皮细胞缺失, 内膜增厚, 有大量泡沫细胞浸润(细胞面积增大、胞浆充满脂滴、核被推至胞浆的边缘), 形成斑块; 辛伐他汀组和马黛通络饮治疗组可见动脉内膜增厚, 泡沫细胞含量较模型组显著减少, 随马黛通络饮浓度增高, 泡沫细胞含量递减, 治疗组可见有大小不等斑块, 但斑块病变较轻, 见图 1。

2.2 对 ApoE^{-/-}小鼠血脂的影响

马黛通络饮高、低剂量组小鼠血清 TG 及 LDL-C 含量较模型组均可明显降低($P<0.05$), 低剂量马黛通络饮对 TC 的影响不大, 而高剂量马黛通络饮可明显降低 TC 水平($P<0.05$), 马黛通络饮低、高剂量均可升高血清 HDL-C 水平($P<0.05$), 大剂量

马黛通络饮干预效果最佳, 见表 1。

2.3 对小鼠 ACAT1 的影响

ELISA 方法检测小鼠主动脉组织中 ACAT1, 经药物干预后, 与模型组比较, 马黛通络饮高剂量组明显降低 ACAT1 水平($P<0.05$)。低剂量组 ACAT1 的降低效果不佳, 见表 1。

2.4 小鼠 LOX-1 的影响

Western blot 检测各组小鼠主动脉组织中 LOX-1 蛋白结果发现, 马黛通络饮高剂量组可降低主动脉组织中的 LOX-1 蛋白水平, 低剂量组降低效果不佳。详见表 1、图 2。

3 讨论

血脂异常是心脑血管疾病的重要危险因素。中医学认为血脂异常是由于嗜食肥甘厚味, 脂质摄入过多, 损伤脾胃, 脾气虚弱, 运化失司, 水湿内停, 聚湿生痰, 痰湿蕴积成膏脂, 阻遏脉道而为瘀, 痰瘀互结, 因脾气虚弱, 膏脂转运、输布不利, 沉积于脉管而导致血脂异常。因此, 脾气不运, 痰瘀互结是高血脂的主要病理基础, 治疗应以活血化瘀、健脾祛湿为主。自拟的马黛通络饮中, 君药马黛是纯天

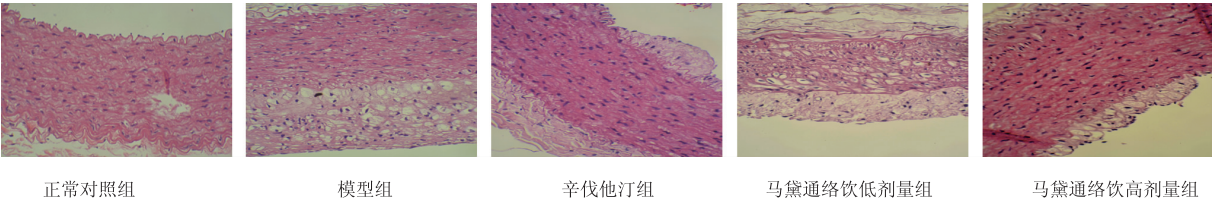


图 1 小鼠主动脉石蜡切片 HE 染色($\times 400$)

表 1 马黛通络饮对小鼠血脂水平及主动脉 ACAT1 的影响($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	ACAT1 (ng/L)	LOX-1/ GAPDH
正常对照组	5.72 \pm 0.41	2.42 \pm 0.24	1.11 \pm 0.29	3.13 \pm 0.14	38.86 \pm 5.76	0.11 \pm 0.05
模型组	8.52 \pm 0.63 ^b	3.71 \pm 0.17 ^b	4.21 \pm 0.35 ^b	1.27 \pm 0.07 ^b	81.13 \pm 9.51 ^b	0.81 \pm 0.09 ^b
辛伐他汀组	5.74 \pm 0.54 ^a	2.74 \pm 0.21 ^{ab}	1.17 \pm 0.47 ^{ab}	2.94 \pm 0.08 ^{ab}	46.41 \pm 7.27 ^a	0.28 \pm 0.045 ^{ab}
马黛通络饮低剂量组	8.14 \pm 0.45 ^b	3.29 \pm 0.24 ^{ab}	2.04 \pm 0.24 ^{ab}	2.11 \pm 0.16 ^{ab}	73.41 \pm 11.35 ^b	0.64 \pm 0.02 ^b
马黛通络饮高剂量组	6.04 \pm 0.65 ^a	2.78 \pm 0.16 ^{ab}	1.19 \pm 0.47 ^{ab}	2.76 \pm 0.26 ^{ab}	51.13 \pm 6.17 ^{ab}	0.41 \pm 0.05 ^{ab}

注: 与模型组比较, ^a $P<0.05$; 与正常对照组比较, ^b $P<0.05$ 。

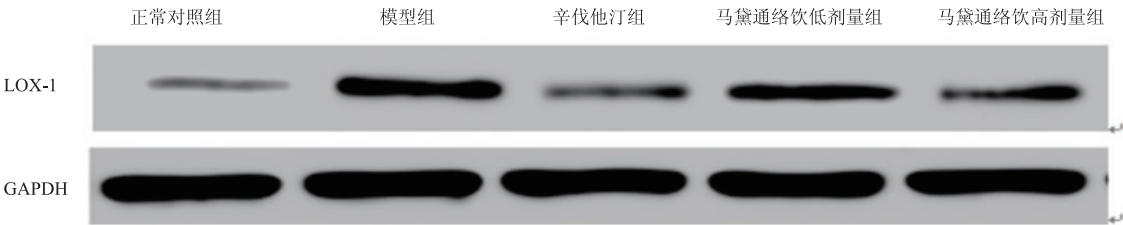


图 2 Western blot 检测马黛通络饮对 LOX-1 蛋白表达的影响

然、无毒副作用的南美冬青科大叶冬青多年草本植物 *Ilex paraguariensis* St. Hil. var. *Paraguariensis* 树上的嫩叶。当地人把马黛制成茶叶饮用,马黛的抗氧化成分占 50% 以上,含有 196 种天然营养成分与生物活性物质,可广泛影响人体各大系统。既往临床、动物、细胞实验研究表明,马黛能够改善血脂四项、血液流变学、血小板功能、血管活性物质的指标,抑制炎症因子的表达,具有调节细胞内脂质蓄积,保护血管内皮,促进胃肠蠕动,增加胆汁分泌等作用,与中药活血化瘀、健脾利湿的功能相近^[8-10]。马黛的这些药物功效与高血脂活血化瘀、健脾祛湿的治法相吻合,因此选择马黛为君药进行治疗;黄芪益气健脾,利水消肿,石菖蒲化湿开胃,开窍豁痰,两药相伍,助君药健脾化痰;桃仁、红花、赤芍、川芎助君药活血祛瘀,共为臣药;佐以当归养血活血,柴胡、桔梗、枳壳调节气机,使气行则血行。甘草调和诸药,为使药,全方合用则具有活血化瘀、健脾利湿、行气化痰之功。本研究针对于此,选取马黛通络饮作为实验用药,分析该方药对 ApoE 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化的干预作用,并探讨其可能的作用机制。

研究表明,血脂水平的降低可减少内膜脂质沉积,逆转 AS 斑块形成^[11]。在血脂代谢过程中,沉积的脂质构成 AS 斑块的脂质核心,胆固醇酯和游离胆固醇是脂质核心的主要成分。斑块内的胆固醇随着血液中 LDL-C 的下降而降低,TC 的下降促进斑块内脂质降低,故 LDL-C 和 TC 水平影响到斑块内的脂质核心^[12]。而 HDL 可以将细胞流出的胆固醇转运至肝脏分解代谢,以胆酸的形式排出体外,达到抗 AS 的作用^[13-14]。本文研究证实了马黛通络饮可以降低血清 TC、TG、LDL-C 含量,升高 HDL-C 含量,使斑块内脂质沉积减少,改善斑块的构成成分,促进 AS 斑块消退和稳定。

LOX-1 特异性大量摄取 Ox-LDL 是形成泡沫细胞的病理基础,同时 ACAT-1 使细胞内游离胆固醇酯化为胆固醇酯,大量的胆固醇酯蓄积在巨噬细胞内,则转化为泡沫细胞^[15]。LOX-1 无限制地摄取修饰的脂蛋白和 ACAT-1 酯化细胞内游离胆固醇转为胆固醇酯是泡沫细胞形成的两个关键步骤^[16],研究表明人或鼠 As 病变 MFC 内有 ACAT-1 大量表达^[17],LOX-1 和 ACAT-1 是参与 As 形成的重要靶点。本部分研究在 ApoE 基因敲除小鼠模型中探讨了马黛通络饮对动脉粥样硬化中 LOX-1 和 ACAT-1 表

达的调节作用,结果显示,马黛通络饮降低了主动脉 LOX-1、ACAT-1 表达,证实了马黛通络饮通过下调泡沫细胞形成基因 LOX-1、ACAT-1 表达而抑制 AS 斑块巨噬细胞内脂质蓄积。

本实验观察了 ApoE^{-/-}小鼠血脂、主动脉内膜及 LOX-1 和 ACAT-1 的表达情况,结果显示马黛通络饮可以调节血脂异常和脂质沉积,具有健脾利湿、行气活血、化痰降脂的效果,对 AS 及心脑血管疾病的发生、发展具有抑制作用。

参 考 文 献

- [1] Arçari DP, Bartchewsky W, dos Santos TW, et al. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis*) in high-fat diet-induced obese mice[J]. *Obesity*, 2009, 17: 2127-2133.
- [2] Pang J, Choi Y, Park T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by hyperlipidemic diet, potential role of AMPK in the visceral adipose tissue[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2008, 476: 178-185.
- [3] Bixby M, Spieler L, Menini T, et al. *Ilex paraguariensis* extracts are potent inhibitors of nitrosative stress, a comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity[J]. *Life Sci*, 2005, 77: 345-358.
- [4] Burris KP, Davidson PM, Stewart CN Jr, et al. Antimicrobial activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) aqueous extracts against *Escherichia coli* O157, h7 and *Staphylococcus aureus* [J]. *J Food Sci*, 2011, 76: 456-462.
- [5] Puangpraphant S, Berhow MA, Vermillion K, et al. Dicafeoylquinic acids in Yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) inhibit NF- κ B nucleus translocation in macrophages and induce apoptosis by activating caspases-8 and -3 in human colon cancer cells[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2011, 55(10): 1509-1522.
- [6] Morais EC, Stefanuto A, Klein GA, et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL cholesterol reduction in individuals on statin therapy[J]. *J Agr Food Chem*, 2009, 57: 8316-8324.
- [7] Mosimann AL, Wilhelm-Filho D, Da Silva EL. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits[J]. *Biofactors*, 2006, 26: 59-70.
- [8] 于少泓. 马黛多酚对动脉粥样硬化形成早期的干预机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2015.
- [9] 于少泓, 吴俊玲, 刘昭纯. 马黛茶临床作用研究进展[J]. *山东中医药大学学报*, 2010, 34(4): 370-372.
- [10] Yu Shaohong, Yue Shou Wei, Liu Zhaochun, et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves microcirculation of volunteers with high blood viscosity: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Experimental Gerontology*, 2015, (62): 14-22.
- [11] Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK. Macrophages: an elusive yet emerging therapeutic target of atherosclerosis[J]. *Med Res Rev*,

- 2008,28(4):483-544.
- [12] Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial [J]. JAMA, 2004, 291(9):1071-1080.
- [13] Wissler RW. Update on the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Am J Med, 1991, 91(1B):3S-9S.
- [14] Koro CE, Bowlin SJ, Stump TE, et al. Low high-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease [J]. Am Heart J, 2006, 151(3):556-563.
- [15] PN DuiTington, B-Mackness, MI Mackness. Paraonase and atherosclerosis [J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2001, 21(4):473-480.
- [16] Jovinge S, Hamsten A, Tomvall R, et al. Evidence for a role of tumor necrosis factor alpha in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease [J]. Metabolism, 1998, 47(1):113.
- [17] Lei L, Xiong Y, Chen J, et al. TNF-alpha stimulates theACAT1 expression in differentiating monocytes to promote the CE-laden cell formation [J]. J Lipid Res, 2009, 50(6):1057-1067.
- (收稿日期: 2016-12-22)
(本文编辑: 董历华)