

何首乌游离蒽醌对兔颈动脉粥样硬化斑块及基质金属蛋白酶-9的影响*

赵健雄^{1**}, 赖陈岑^{1**}, 王和生^{2***}, 王永萍², 杨长福²

(1. 贵阳中医学院 生物化学教研室, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院 生物化学教研室, 贵州 贵阳 550002)

[摘要] 目的: 研究何首乌游离蒽醌对动脉粥样硬化(AS)的影响。方法: 40只新西兰大白兔, 随机分为AS模型组、何首乌高剂量干预组、中剂量干预组、低剂量干预组、血脂康组和正常组, 除正常组外, 用免疫注射法加高脂饲料喂养法进行兔颈AS模型的复制, 全部从兔耳缘静脉注射牛血清白蛋白, 在免疫注射当天, 同时开始喂食高脂饲料; 16周后, 给予何首乌游离蒽醌高中低3个不同剂量灌胃, 阳性对照组给予血脂康灌服; 给药4周后取材, 观察兔颈动脉粥样硬化病理改变, 取胸主动脉和腹主动脉做实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测基质金属蛋白酶-9(MMPs-9)。结果: HE结果显示何首乌游离蒽醌中剂量组能延缓AS的发生和发展; MMPs的表达显示, 模型组与正常组相比($P < 0.05$), 提示模型复制成功; 高中低剂量组、阳性组与模型组相比($P < 0.05$), 有统计学意义, 提示何首乌游离蒽醌和血脂康胶囊都能干预MMPs-9的表达; 阳性组与高中低剂量组相比($P < 0.05$), 有统计学意义。结论: 何首乌游离蒽醌能干预AS的病变发展, 其机制可能与影响MMPs-9有关。

[关键词] 何首乌; 蒽醌类; 动脉硬化; 基质金属蛋白酶; 兔

[中图分类号] R285.5; R543.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)08-0797-04

Effect of Free Anthraquinone in Fallopia Multiflora on Carotid Atherosclerosis and MMPs-9

ZHAO Jianxiong¹, LAI Chencen¹, WANG Hesheng², WANG Yongping², YANG Changfu²

(1. Department of Biochemistry, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, Guizhou, China;

2. Graduate School, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the influence of free anthraquinone in fallopia multiflora on atherosclerosis (AS). **Methods:** Divide New Zealand rabbits into 6 groups randomly: model group, high dose group, mid-dose group, low dose group, control group and normal group. Injecting with bovine serum albumin (BSA) from ear veins, feeding all the rabbits with high-fat diet from day one except normal group. After 16 weeks, irrigation with high dose, mid-dose and low dose free anthraquinone in fallopia multiflora, and feed the rabbits of control group with Xuezhikang. Taking samples to observe the pathologic change of rabbit AS and adopting the RT-PCR on aorta thoracica and aorta abdominalis to test MMPs-9 after 4 weeks. **Results:** Mid-dose group of free anthraquinone in fallopia multiflora was effective to delay the occurrence and development of AS. MMPs expression indicated that in comparison of model group and normal group, $P < 0.05$, which means duplication of model was successful; comparing three different dose groups, positive group and model group, differences were statistical significant ($P < 0.05$). This has proved that free anthraquinone in fallopia multiflora and Xuezhikang were both effective to intervene the expression of MMPs-9, comparing positive group and three different

*[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81160473; No. 81460670); 贵州省科技厅基金资助项目[黔科合J字(2013)2063]; 贵州省科技英才青年培养工程项目[黔省专合(2012)0165]; 贵阳中医学院研究生教育创新项目(No. ZYYCX12016; No. ZYYCX14011)

** 贵阳中医学院研究生

*** 通信作者 E-mail: wanghsh0413@126.com

网络出版时间: 2015-07-12 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20150712.0846.010.html>

dose groups, differences are statistical significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** Free anthraquinone in *Fallopia multiflora* has an intervention effect on the development of AS, its mechanism might be relevant to its effect on MMPs-9.

[**Key words**] *polygonum multiflorum*; anthraquinones; atherosclerosis; matrix metalloproteinases; rabbits

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)所致心脑血管疾病是目前威胁人类健康的常见病和多发病,是引起人类死亡的主要疾病,心脑血管疾病导致的死亡人数占全球疾病死亡人数的 50% 以上,也是中国人的首位死因^[1-2],已占我国总死因的 40%。因此探索 AS 的病因、发病机制及防治药物的开发有重要的意义。何首乌是传统补益药材,在宋朝唐慎微编著的《证类本草》中早有“止心痛”的记载。本研究拟以基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases, MMPs-9)为切入点,从分子水平上研究何首乌游离蒽醌提取物有效部位对 AS 及 MMPs-9 的影响,进一步阐明其抗 AS 的机制,为防治 AS 疾病提供理论及实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验药物和材料

丙硫氧嘧啶片(南通精华制药集团股份有限公司),牛血清白蛋白(BSA)、胆固醇和脱氧胆酸钠(solarbio),维生素 D₃(陕西森弗生物技术有限公司),超纯 RNA 提取试剂盒、HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂、UltraSYBR Mixture(With ROX、DNase 和 5x RNA Loading Buffer(北京康为世纪生物科技有限公司),引物合成由 Invitrogen 提供。何首乌药材产地为贵州省施秉县。炮制何首乌药材打粉,80% 乙醇提取,提取液于旋转蒸发仪上浓缩,10% 硫酸酸化,加二氯甲烷萃取三次,合并萃取液,减压回收二氯甲烷,残渣减压干燥,得何首乌游离蒽醌提取物备用。阳性组药物血脂康胶囊由北京北大维信生物科技有限公司生产,国药准字 Z10950029。

1.2 实验动物及分组

新西兰大白兔 40 只,雄性,3 月龄,体质量 2.2 ~ 2.8 kg,由贵阳医学院医学动物实验中心提供。新西兰大白兔适应性喂养 1 周后,随机分为 6 组,分别为 AS 模型组 10 只,何首乌蒽醌高剂量组、中剂量组、低剂量组、血脂康阳性组和正常组各 6 只。

798

1.3 AS 动物模型制备

除正常组外,全部给予高脂饲料喂养(用 15% 蛋黄、5% 猪油、0.5% 胆固醇、0.5% 脱氧胆酸钠、0.5% 丙硫氧嘧啶、0.5% 维生素 D₃ 和 78% 基础饲料均匀混合),同时从兔耳缘静脉注射牛血清免疫白蛋白 250 mg/kg,1 次/周,连续 3 周^[3-6]。高脂饲料喂养 16 周。解剖实验用兔 2 只,颈动脉有脂纹形成,造模成功。

1.4 给药方法

造模成功后,给予药物治疗 4 周,何首乌游离蒽醌高剂量组 15 mg/kg,何首乌游离蒽醌中剂量组 7.5 mg/kg,何首乌游离蒽醌低剂量组 3.75 mg/kg,血脂康胶囊阳性组 400 mg/kg。

1.5 观察指标

给药结束后,取材前夜禁食,第 2 日处死动物,取左右颈总动脉,从近心端一直取到颌下,用 0.9% 的生理盐水清洗干净,放置在 4% 的多聚甲醛溶液中进行固定。颈动脉组织石蜡包埋、切片、HE 染色,电子显微镜观察病理改变。检测 MMPs-9 在主动脉中的表达:剖开胸腹部暴露胸主动脉和腹主动脉,取部分胸主动脉和腹主动脉,迅速放置在 -80 °C 的液氮中保存,备用。用超纯 RNA 提取试剂盒提取兔组织 RNA,通过 HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录,再以 UltraSYBR Mixture(With ROX)进行扩增,扩增程序为:95 °C 10 min, (95 °C 15 s, 60 °C 60 s) x 45 个循环。引物设计, MMPs-9 上游引物 5'-CCAAACTACTCCGAAGACCTGC-3',下游:5'-CGACCCCAAAGTGGATGACA-3',扩增产物大小 143 bp;内参 ACTIN 上游引物:5'-AGATCGTGCGGACATCAAG-3',ACTIN 下游引物 5'-CAGGAAGGAGGGCTGGAAGA-3',扩增产物大小 182 bp。

1.6 统计学方法

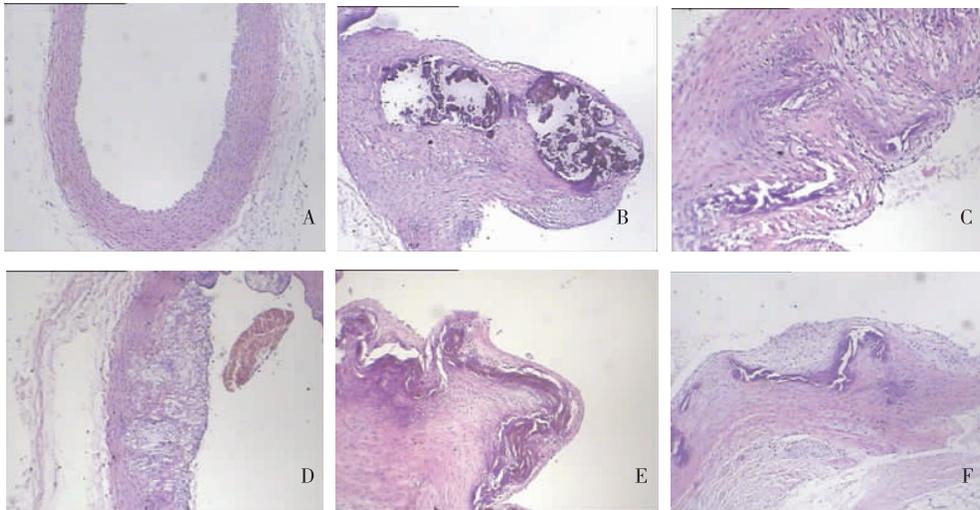
数据采用 SPSS 17.0 软件包进行统计分析,计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 颈动脉 HE 结果

本实验 HE 结果显示,何首乌游离蒽醌中剂量

组处于脂纹期朝向纤维斑块期发展的阶段;而其他各组(模型组、高低剂量组和血脂康组)表现出了复合病变的典型特征 - 钙化,处于 AS 的第 4 期。见图 1。



A 为正常组, B 为模型组, C、D 和 E 为何首乌游离蒽醌高、中、低剂量组, F 为阳性组

图 1 各组家兔动脉血管壁组织学表现(HE, $\times 100$)

Fig. 1 The histological change of blood vessels

2.2 MMPs-9 表达

模型组与正常组相比($P < 0.05$),提示模型复制成功。何首乌游离蒽醌高中低剂量组、血脂康组与模型组相比($P < 0.05$),有统计学意义,提示何首乌游离蒽醌和血脂康胶囊都能干预 MMPs-9 的表达。血脂康组与何首乌游离蒽醌高中低剂量组相比($P < 0.05$),有统计学意义。见表 1。

表 1 各组家兔主动脉壁 MMPs-9 表达($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The expression of MMPs-9 of rabbit's aorta

组别	MMPs-9
AS 正常组	0.000 8 \pm 0.000 2 ⁽¹⁾
模型组	1.009 3 \pm 0.018 6
何首乌 高剂量组	0.299 6 \pm 0.043 2 ⁽¹⁾⁽²⁾
中剂量组	0.673 6 \pm 0.209 1 ⁽¹⁾⁽²⁾
低剂量组	0.598 4 \pm 0.053 39 ⁽¹⁾⁽²⁾
血脂康阳性对照组	0.073 5 \pm 0.036 7 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与模型组比较, $P < 0.05$;⁽²⁾与血脂康组相比, $P < 0.05$

3 讨论

实验选用雄性的新西兰大白兔,由于雌激素会减缓动脉粥样硬化的发生发展^[7-8]。AS 的发展一般分为 4 期,分别是:(1)早期的脂点和脂纹病变,也被成为脂质条纹期;(2)纤维斑块;(3)粥样斑

块;(4)复合病变。本实验 HE 结果显示,何首乌游离蒽醌中剂量组有明显的延缓 AS 病理发展变化的作用,使其处于脂纹期朝向纤维斑块期发展的阶段;而其他各组(模型组、高低剂量组和血脂康组)表现出了复合病变的典型特征 - 钙化,处于 AS 的第 4 期,也提示何首乌游离蒽醌的用量应该在更多剂量上进一步探索。

MMPs 是造成冠状动脉斑块破裂的主要原因。MMPs 是 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 依赖的酶家族,能特异性与细胞外基质成分相结合并降解细胞外基质,在胚胎发育、细胞迁移、伤口愈合、组织吸收等过程中发挥重要作用。在正常的动脉组织内检测不到蛋白水解酶活性,但在 AS 斑块,特别是在不稳定斑块内, MMPs 等蛋白水解酶的活性显著升高,目前认为动脉硬化斑块不稳定性与基质金属蛋白酶的增加密切相关^[9]。MMPs-9 是 MMPs 家族中分子量最大的一种,在正常的血管壁只有微量的 MMPs-9 表达,而在 AS 血管壁, MMPs-9 的活性增强,含量较多^[10]。

本研究结果显示,何首乌游离蒽醌对 MMPs-9 产生了干预作用,特别是高剂量组干预效果最好;中剂量组和 HE 结果趋势不太一致的原因,可能是正处在巨噬细胞向巨噬泡沫细胞转化阶段,所以表达量偏高。有研究表明, MMPs-9 也受到上游的核

转录因子 kappa B (NF- κ B) 的调控, 而 NF- κ B 在稳定心绞痛选择性和显著性的激活时, 不受冠状动脉疾病的严重程度或者用药治疗方法的影响^[11], 因此可能导致何首乌游离蒽醌 MMPs-9 的干预效果与 HE 染色显示的 AS 斑块发展趋势不一致。总之, 何首乌游离蒽醌对 MMPs-9 起到了一定的干预作用。其抗 AS 的分子机制有待进一步研究。

4 参考文献

- [1] 殷亚昕, 刘润梅, 翟红霞, 等. 不同饲料联合维生素 D3 建立大鼠动脉粥样硬化模型的比较[J]. 中国康复理论与实践, 2010(12):1134-1136.
- [2] 王纯, 梁雨露. 高血压患者颈动脉斑块和急性缺血性脑卒中的相关性[J]. 贵阳医学院学报, 2014(1):80-83.
- [3] 何新群, 岳增辉, 常小荣, 等. 动脉粥样硬化兔模型的建立及评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2010(9):27-29.
- [4] 王园园, 龙民慧, 周磊磊, 等. 兔动脉粥样硬化动物模型的建立和评价[J]. 实验动物科学, 2008(3):18-21.
- [5] 李琳, 窦健霖, 楚天舒, 等. 高脂饲料喂养加静脉注射小牛血清白蛋白建立兔动脉粥样硬化模型[J]. 中国组织工程研究, 2012(20):3690-3693.
- [6] 莫链杰, 陈晨, 胡希文, 等. 不同免疫程序制备兔抗牛血清白蛋白抗血清的效价比较[J]. 健康研究, 2009(2):95-97.
- [7] Knopp RH, Paramsothy P, Retzlaff BM, et al. Sex differences in lipoprotein metabolism and dietary response: basis in hormonal differences and implications for cardiovascular disease[J]. Curr Cardiol Rep, 2006(8):452-459.
- [8] Miller AA, Drummond GR, Mast AE, et al. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen [J]. Stroke, 2007(38):2142-2149.
- [9] 罗玉梅, 万新红, 姜德谦, 等. 罗格列酮对急性冠状动脉综合征患者外周血单核细胞源性巨噬细胞表达基质金属蛋白酶 9 和组织型基质金属蛋白酶抑制剂 1 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009(2):132-161.
- [10] 林梅瑟, 陈碧新, 赵志光, 等. 姜黄素对动脉粥样硬化兔基质金属蛋白酶 9 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007(3):189-192.
- [11] Ritchie ME. Nuclear factor-kappaB is selectively and markedly activated in Humans with unstable angina pectoris[J]. Circulation, 1998(17):1707-1713.

(2015-03-07 收稿, 2015-05-26 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅

(上接第 796 页)

- [2] Michl P, Gress TM. Current concepts and novel targets in advanced pancreatic cancer[J]. Gut, 2013(2):317-326.
- [3] Wang Y, Kim S, Kim IM. Regulation of Metastasis by microRNAs in Ovarian Cancer[J]. Front Oncol, 2014(4):143.
- [4] Blandino G, Fazi F, Donzelli S, et al. Tumor suppressor microRNAs: a novel non-coding alliance against cancer[J]. FEBS Lett, 2014(16):39-52.
- [5] Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs[J]. Nat Rev Genet, 2007(2):93-103.
- [6] Alrfaei BM, Vemuganti R, Kuo JS. microRNA-100 targets SMRT/NCOR2, reduces proliferation, and improves survival in glioblastoma animal models[J]. PLoS One, 2013(11):e80865.
- [7] Chen P, Zhao X, Ma L. Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cell Biochem, 2013(1-2):49-58.
- [8] Oliveira JC, Brassescio MS, Morales A G, et al. MicroRNA-100 acts as a tumor suppressor in human bladder carcinoma 5637 cells[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011(11):3001-3004.
- [9] Li Z, Li X, Yu C, et al. MicroRNA-100 regulates pancreatic cancer cells growth and sensitivity to chemotherapy through targeting FGFR3[J]. Tumour Biol, 2014.
- [10] Rachagani S, Kumar S, Batra SK. MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications[J]. Cancer Lett, 2010(1):8-16.
- [11] Park J-K, Henry JC, Jiang J, et al. miR-132 and miR-212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011(4):518-523.
- [12] Li XJ, Luo XQ, Han BW, et al. MiR-100/99a, deregulated in acute lymphoblastic leukaemia, suppress proliferation and promote apoptosis by regulating the FKBP51 and IGF1R/mTOR signalling pathways[J]. Br J Cancer, 2013(109):2189-2198.

(2015-04-13 收稿, 2015-06-05 修回)
中文编辑: 刘平; 英文编辑: 赵毅