

最小。

溶血实验结果可以作为预测眼刺激性的依据,但不能完全代替眼刺激在体实验。本实验表明在各自的临床剂量范围内,羟苯乙酯与冰片的合用不会显著增加其眼刺激性。实验也为眼制剂处方设计提供安全剂量参考范围,其最适浓度范围需结合羟苯乙酯与冰片合用后的抑菌效果最终评判。

参考文献:

[1] 黄兆胜. 中药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 405-406.

[2] 陈艳明, 王宁生. 冰片对血脑屏障体外模型细胞间紧密连接和细胞吞饮囊泡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24 (7): 632-634.

[3] 孙晓萍, 欧立娟, 宓德卿, 等. 冰片抗炎镇痛作用的实验研究[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(5): 353-355.

[4] 伍海涛, 王宁生, 宓德卿, 等. 眼用制剂中清凉剂的气相色谱测定方法[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(2): 190-193.

[5] 梁光江, 王延东, 叶成添, 等. 滴眼剂中常用几种抑菌剂的应用和观察[J]. 今日药学, 2010, 20(3): 43-44.

[6] 曾嵘, 阎敏, 张志刚. 羟苯乙酯在荧光素钠滴眼剂中防腐效度分析[J]. 实用预防医学, 2006, 13(3): 761-762.

[7] Tang Liu DD, Richman JB, Weinkam RJ, et al. Effects of four

penetration enhances on corneal permeability of drugs in vitro[J]. J Pharm Sci, 1994, 83(1): 85.

[8] 廖南英, 刘启德, 宓德卿, 等. 溶血试验替代滴眼液眼刺激性试验的可行性研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6): 648-652.

[9] 薛金玉, 杨杏芬, 杨颖, 等. 红细胞溶血实验替代兔眼刺激性实验检测农药眼刺激性初步研究[J]. 中国职业医学, 2010, 37(6): 469-471.

[10] Okamoto. Y, Ohkoshi. K, Itagaki. H, et al. Interlaboratory validation of The in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients[J]. Toxicology in Vitro, 1999, 13: 115-124.

[11] 廖南英, 伍海涛, 梁小雯, 等. 冰片与苯扎氯铵合用对红细胞及角膜上皮细胞的损伤效应[J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(3): 245-249.

[12] 陈鸿, 潘宁玲, 王国林. 等辐射分析法的原理及应用[J]. 国外医学(麻醉学与复苏分册), 2004, 25(5): 267-269.

[13] Luszczi JJ. Isobolographic analysis of interaction between drugs with nonparallel dose response relationship curves: a practical application. [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2007, 375: 105-114.

[14] 管崢, 毕姗姗, 杨璐, 等. 响应曲面模型在麻醉药合用中药物-药物相互作用研究的进展[J]. 药学报, 2008, 43(12): 1171-1178.

[15] 高原, 高鸿慈. 滴眼剂的开发和生产[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009: 351.

(编辑: 修春)

Visfatin 在 ApoE 基因缺陷小鼠动脉粥样硬化发展中的作用及丹参酮 II A 干预研究

杨萍¹, 周玉平¹, 谢宪兵² (1. 南昌市中西医结合医院, 江西 南昌 330002; 2. 南昌大学医学院, 江西 南昌 330006)

摘要: **目的** 探讨 visfatin 蛋白在动脉粥样硬化(AS)病变成中的作用, 以及丹参酮 II A 抗载脂蛋白 E 基因缺陷(apoE-/-)小鼠 AS 病变的可能机制。**方法** 将 C57BL/6J 背景的 apoE-/- 小鼠随机分为 4 组: 模型组, 丹参酮 II A 高、低剂量组, 阳性对照组(辛伐他汀组), 每组 8 只。并以 8 只 C57BL/6J 小鼠作为空白对照组。apoE-/- 小鼠给予高脂饮食, 并按分组情况给予丹参酮 II A 磺酸钠(20, 10 mg·kg⁻¹)或辛伐他汀(5 mg·kg⁻¹)干预。第 14 周后全部处死, HE 染色观察动脉斑块形成程度, 测定斑块面积与管腔面积之比。酶法检测血清脂质含量。ELISA 方法检测血清高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、金属基质蛋白酶-9(MMP-9)含量。采用 western blotting 法检测主动脉壁 visfatin 表达。**结果** (1)空白对照组主动脉未见动脉粥样硬化改变, 模型组有较明显的主动脉内膜增厚及粥样斑块的形成。模型组血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平及 hs-CRP、TNF-α、MMP-9 表达、动脉壁 visfatin 表达显著高于空白对照组, 而高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平则显著低于空白对照组(均 P<0.05)。(2)与模型组比较, 丹参酮 II A 高、低剂量组、辛伐他汀组均可显著减少斑块面积与管腔面积比值, 降低血脂中 TC、TG、LDL-C 水平 (P<0.05), 升高 HDL-C 水平 (P<0.05); 明显降低血清细胞因子 hs-CRP、TNF-α、MMP-9 水平, 降低小鼠主动脉壁 visfatin 表达。(3)在减少斑块面积、改善血脂水平、抑制炎症、抑制 visfatin 表达方面, 丹参酮 II A 均具有

收稿日期: 2014-05-23

作者简介: 杨萍, 女, 主治医师, 博士研究生, 研究方向: 中西医结合防治心血管病研究。Email: jnuyangping@126.com.

基金项目: 江西省自然科学基金(20114BAB215048)。

显著的剂量依赖性。丹参酮 II A 高剂量在减少斑块面积、改善血脂水平方面与辛伐他汀差异无显著性意义,但在降低 hs-CRP、TNF- α 、MMP-9 水平,以及下调主动脉壁 visfatin 表达方面显著优于辛伐他汀组。(4)apoE-/-小鼠动脉壁组织 visfatin 表达水平与血清 hs-CRP、TNF- α 、MMP-9 水平具有显著的正相关关系。**结论** visfatin 参与了 AS 的发生发展,其参与机制可能与炎症机制有关。丹参酮 II A 可能通过调节 apoE-/- 小鼠血脂代谢、抑制炎症细胞因子 hs-CRP、TNF- α 、MMP-9 的表达,及下调主动脉壁 visfatin 表达,进而抑制 apoE-/- 小鼠 AS 病变的形成发展。

关键词: 动脉粥样硬化; 丹参酮 II A; 内脏脂肪素; 炎症细胞因子; 血脂

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)06-0674-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.06.007

Role of Visfatin in Development of Atherosclerosis and Intervention of Tanshinone II A in ApoE Gene Knock-out Mice

YANG Ping¹, ZHOU Yuping¹, XIE Xianbing²(1. Nanchang Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Nanchang 330002 Jiangxi, China; 2. Nanchang University Medical School, Nanchang 330006 Jiangxi, China)

Abstract: Objective To study the influence of visfatin on the development of atherosclerosis(AS), and to explore the possible anti-atherosclerotic mechanism of Tanshinone II A sodium in ApoE gene knock-out mice. **Methods** C57BL/6J genetic background ApoE-/- mice were randomly divided into model group, high-dose Tanshinone II A group(20 mg·kg⁻¹), low-dose Tanshinone II A group(10 mg·kg⁻¹), and Simvastatin group(5 mg·kg⁻¹), 8 mice in each group. Eight wild-type male C57BL/6J mice were used for blank control. ApoE-/- mice were fed with high fat diet for 14 weeks to induce AS. At the end of the experiment, the mice were executed. The aortic plaque was observed after HE dyeing, and the ratio of plaque area to arterial lumina area was calculated. The serum lipid contents were observed with enzyme method. Serum inflammation cytokines such as high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), tumor necrosis factor alpha(TNF- α) and matrix metalloproteinase -9(MMP-9) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Total protein was extracted from aortic tissue for detecting the expression of Visfatin by western blotting.

Results (1)Blank control group showed no distinctive changes of atherosclerosis, model group had distinctive increase of aortic intima thickness and atherosclerotic plaque formation. Model group also had high serum levels of total cholesterol(TC), triglyceride(TG) and low-density lipoprotein(LDL), and high inflammatory cytokines of hs-CRP, TNF- α , MMP-9, as well as high visfatin expression in aorta tissue. However, high-density lipoprotein(HDL) in the model group was lower than the blank control group($P < 0.05$). (2)Compared with the model group, the ratio of plaque area to arterial lumina area was reduced, the serum levels of TC, TG, and LDL-C were decreased($P < 0.05$), HDL-C was increased($P < 0.05$), and inflammatory cytokines of hs-CRP, TNF- α , MMP-9 as well as visfatin expression were lowered in high- and low-dose Tanshinone II A groups and Simvastatin group.(3)Tanshinone II A could reduce plaque area, improve serum lipid, suppress inflammation and visfatin expression in significant dose-dependent manner. The differences in reducing plaque area and improving serum lipids between high-dose Tanshinone II A group and Simvastatin group were insignificant, but were significant in lowering hs-CRP, TNF- α , MMP-9 as well as visfatin expression. (4)Positive correlation was shown between visfatin expression and the levels of inflammatory cytokines of hs-CRP, TNF- α and MMP-9. **Conclusion** Visfatin plays a role in the development of atherosclerosis, the possible mechanism may be associated with inflammatory cytokines. Tanshinone II A could inhibit the development of atherosclerosis by regulating serum lipids, suppressing inflammation factors of hs-CRP, TNF- α and MMP-9, and down-regulating the expression of visfatin.

Keywords: Atherosclerosis; Tanshinone II A sodium; Visfatin; Inflammatory cytokines; Serum lipids

丹参酮 II A(tanshinone II A)是丹参的主要有效成分,目前其钠盐制剂丹参酮 II A 磺酸钠注射液

(tanshinone II A sodium)已被用于冠心病的防治,取得了满意的疗效^[1-2]。

已有大量证据表明^[3]代谢和炎症反应异常与动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)的发生发展有着密切关系,降脂与抑制炎症结合能更有效地抑制AS病变的发生与发展。内脏脂肪素(Visfatin)是一种主要由内脏脂肪组织分泌的新脂肪因子。研究显示,Visfatin参与炎症、能量代谢及免疫调节过程,与肥胖、糖尿病、冠心病等复杂性疾病发病机制密切相关^[4]。目前国内外有关Visfatin在冠心病患者的变化报道不多,且结果不完全一致,对影响Visfatin水平变化相关因素的研究也很少。

本研究通过高脂饮食喂养载脂蛋白E基因缺陷(apoE-/-)小鼠制备动脉粥样硬化动物模型,观察主动脉壁visfatin在apoE-/-模型组与野生型小鼠中表达的差异,探讨visfatin在动脉粥样硬化病变成中扮演的作用。通过检测血清脂质及炎症介质高敏C反应蛋白(hs-CRP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、金属基质蛋白酶-9(MMP-9)表达,了解Visfatin与炎症介质的交互作用,通过给予不同剂量丹参酮II A磺酸钠进行干预,对比各组中上述指标的表达水平,阐述丹参酮II A抑制AS病变的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物 ApoE-/-小鼠及野生型C57BL/6J小鼠,雄性,SPF级,8周龄,体质量18~25 g,北京大学医学部动物实验中心提供,动物许可证号:SCXK(京)2006-0008。高脂饲料(0.15%胆固醇,21%猪油,78.85%原粮),广东省医学实验动物中心配制,许可证号:SCXK(粤)2008-0002。

1.2 药物及试剂 阳性对照用药为辛伐他汀,杭州默沙东制药有限公司,批号:090805;丹参酮II A磺酸钠注射液,上海第一生化药业有限公司,批号:120119;三酰甘油(TG)试剂盒(批号:110541),血清总胆固醇(TC)试剂盒(批号:110821),高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(批号:090162),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒(批号:120531),均为北京中生北控生物科技股份有限公司;hs-CRP试剂盒(批号:CSB-E08617h),TNF- α 试剂盒(批号:CSB-E04741m),MMP-9 ELISA试剂盒(批号:CSB-EL014679BO),均为武汉华美生物工程有限公司;visfatin ELISA试剂盒,美国R&D公司,批号:AF4335。其余试剂为国产分析纯。

1.3 仪器 酶标定量测定仪,德国Thermo公司;全自动生化仪,意大利爱康公司;Eclipse Ti荧光倒置显微镜,日本尼康公司。

1.4 分组及给药方法 将ApoE-/-小鼠随机分为4组($n=8$):模型组,丹参酮II A高、低剂量组,阳性对照组(辛伐他汀组),并以8只C57BL/6J小鼠作为空白对照组。ApoE-/-小鼠均高脂饲料喂养,空白对照组普通饲料喂养。丹参酮II A高、低剂量组给予腹腔注射丹参酮II A磺酸钠注射液剂量为 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,辛伐他汀组给予辛伐他汀药液灌胃 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,模型组和空白对照组灌服等剂量生理盐水,均为每天1次。根据小鼠体质量(每周测量1次)以校正给药量,14周后停止高脂饮食及药物干预。丹参酮II A磺酸钠与辛伐他汀的剂量均根据成人临床常规用量等效换算为小鼠用量。

1.5 标本采集 于实验第14周后取材。取材前禁食12 h。经眼眶采血1.5 mL,立即离心($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 800 g, 15 min),血液标本冻存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。处死动物时,用生理盐水逆行灌注各组小鼠主动脉,自主动脉根部至腹主动脉离断整个血管,切取临近主动脉根部的0.5厘米,纵行剖开展平后,留取一部分新鲜组织放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。另取一部分用4%多聚甲醛固定液于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。常规经脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋处理后制作病理切片。

1.6 主动脉病理损伤组织学观察 主动脉根部连续石蜡切片,片厚 $5\text{ }\mu\text{m}$,每间隔8张取1张,共取6张切片做HE染色,进行组织病理学观察,Image Pro Plus 6.0图像分析软件测量血管管腔面积(LA)、斑块面积(PA)和斑块面积与管腔面积之比PA/LA。

1.7 指标检测酶法检查血清血脂四项 采用ELISA方法检测血清hs-CRP、TNF- α 、MMP-9等炎症有关的细胞因子的浓度。采用western blotting法检测组织中主动脉壁组织中visfatin的表达水平,图像处理软件Image Tool 3.0测灰度值,并与内参相比获得相对灰度值。

1.8 统计学处理方法 采用SPSS20.0统计软件包进行分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差one-way ANOVA进行方差分析,方差齐时采用LSD法进行组间多重比较,方差不齐时采用Dunnnett's T3法进行组间多重比较,变量间的相关的因素采用逐步多元直线回归分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠主动脉病变观察 各组小鼠主动脉病理形态观察HE染色可见:空白对照组C57BL/6J小鼠主动脉中膜平滑肌细胞排列规则,主动脉壁内膜较薄,结构完整,内膜下无脂质沉积,未见泡沫细胞形

成等动脉粥样硬化改变(图 1 A)。各组 apoE^{-/-} 小鼠主动脉壁存在不同程度的动脉粥样硬化病灶形成。其中模型组可见中膜平滑肌细胞增生并且排列紊乱, 主动脉内膜增厚、内皮细胞部分脱落, 动脉粥样硬化斑块体积较大, 大量泡沫细胞形成和堆积, 突向管腔, 管腔明显狭窄(图 1B)。丹参酮 II A 高剂量组和辛伐他汀组 AS 病变较模型组显著减轻: 两组动脉壁内膜较薄, 内皮细胞基本完好未见明显脱落, 中膜无明显增厚, 平滑肌细胞排列较规则, 增生不明显, 未见显著泡沫细胞形成(图 1C、图 1E), 丹参酮 II A 低剂量组仍可见显著的内膜增厚和动脉粥样斑块形成, 但程度较模型组显著减轻(图 1D)。

表 1 结果显示, 与空白对照组比较, 模型组 LA 明显缩小, 而 PA 及 PA/LA 显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 各给药组 LA、PA 及 PA/LA 均不同程

度改善, 以辛伐他汀组、丹参酮 II A 高剂量组作用最明显, 提示丹参酮 II A 高剂量和辛伐他汀抑制 AS 病变的效果差异无显著性意义, 但丹参酮 II A 抗 AS 存在一定的量效关系。

表 1 各组小鼠 LA、PA 及 PA/LA 比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Comparison of LA, PA and PA/LA in each group

组别	LA/ μm^2	PA/ μm^2	PA/LA/%
空白对照组	521379.63 ± 35275.13	5704.25 ± 1087.27	1.10 ± 0.23
模型组	379115.38 ± 47131.83*	114900.38 ± 24120.52*	30.41 ± 5.60*
丹参酮 II A 高剂量组	468877.50 ± 29532.23 [#]	42846.38 ± 9954.98 [#]	9.18 ± 2.52 [#]
丹参酮 II A 低剂量组	420367.88 ± 35425.29 [#]	64938.63 ± 7111.21 [#]	15.49 ± 1.68 [#]
辛伐他汀组	459677.25 ± 31977.53 [#]	38247.25 ± 5343.18 [#]	8.36 ± 1.35 [#]
统计值	17.305	35.393	35.738
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。



注: A. 空白对照组; B. 模型组; C. 丹参酮高剂量组; D. 丹参酮低剂量组; E. 辛伐他汀组。

图 1 各组小鼠主动脉病变病理观察(免疫组化, ×200)

Figure 1 Observation of the pathology of atheromatous plaque in each group(immunohistochemical staining, ×200)

A. normal control group; B. model group; C. Tanshinone II A high-dose group; D. Tanshinone II A low-dose group; E. Simvastatin group

2.2 各组小鼠血脂各项指标的变化 对各组小鼠血清脂质水平测定表明, 各组间血脂水平差异有显著性意义。多重比较结果: 除丹参酮 II A 磺酸钠高剂量组与辛伐他汀组血四脂水平差异无显著意义外, 其余各组血四脂水平均有统计学差异, TC、TG、LDL-C 水平以模型组 TC、TG、LDL-C 最高, 空白组最低。HDL-C 水平以空白组最高, 模型组最低。表明, 丹参酮 II A 磺酸钠具有显著的改善高脂血症作用, 其作用成剂量依赖性, 且高剂量丹参酮 II A 磺酸钠降脂作用与辛伐他汀无显著性差异。结果见表 2。

2.3 各组小鼠血清 hs-CRP、TNF- α 、MMP-9 水平的变化 结果显示, 各组血清 hs-CRP、TNF- α 、MMP-9 水平异有显著性意义。多重比较结果: 除丹参酮 II A 磺酸钠高剂量组与辛伐他汀组血清 hs-CRP、TNF- α 、MMP-9 水平差异无显著意义外, 其余各组水平均有统计学差异, 以模型组最高, 空白组最低。丹参酮 II A 呈剂量依赖性降低血清 hs-CRP、TNF- α 、MMP-9 水平, 且丹参酮 II A 高剂量降低血清 hs-CRP、TNF- α 、MMP-9 作用显著优于辛伐他汀

表 2 各组小鼠血脂水平比较($\bar{x} \pm s, \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}, n=8$)

Table 2 Comparison of the serum lipids level in each group

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
空白对照组	2.80 ± 0.13	1.15 ± 0.10	2.00 ± 0.17	1.08 ± 0.12
模型组	9.50 ± 0.45*	4.48 ± 0.28*	6.41 ± 0.37*	0.72 ± 0.12*
丹参酮 II A 高剂量组	5.96 ± 0.22 [#]	2.35 ± 0.31 [#]	3.70 ± 0.33 [#]	0.93 ± 0.17 [#]
丹参酮 II A 低剂量组	6.39 ± 0.39 [#]	3.07 ± 0.28 [#]	4.63 ± 0.41 [#]	0.80 ± 0.11 [#]
辛伐他汀组	5.87 ± 0.41 [#]	2.23 ± 0.20 [#]	3.41 ± 0.33 [#]	0.96 ± 0.08 [#]
F 值	389.874	199.935	193.455	10.923
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$ 。

组。
2.4 各组小鼠主动脉壁组织中 visfatin 表达 通过分析各组目的条带图像发现, 各组间主动脉组织中 Visfatin 蛋白的表达差异有显著性意义($F=65.163, P=0.000$)。其中模型组 Visfatin 蛋白表达最高, 空白对照组最低。丹参酮 II A 呈剂量依赖性下调 Visfatin 蛋白表达, 且其抑制作用显著优于辛伐他汀组, 各组间 Visfatin 蛋白的表达两两比较差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

表 3 各组血清 hs-CRP、TNF-α、MMP-9 水平比较($\bar{x} \pm s$, ng·mL⁻¹, n=8)

Table 3 Comparison of the level of hs-CRP, TNF-α and MMP-9 in each group

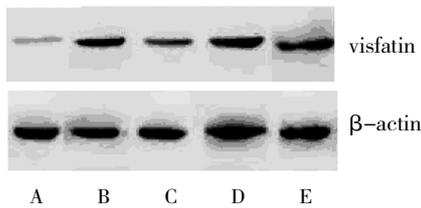
组别	hs-CRP	TNF-α	MMP-9
空白对照组	111.94 ± 17.29	60.73 ± 10.38	77.22 ± 11.49
模型组	218.23 ± 15.30*	169.22 ± 10.88*	168.92 ± 11.34*
丹参酮 II A 高剂量组	129.18 ± 9.59#	90.38 ± 15.09#	87.19 ± 9.20#
丹参酮 II A 低剂量组	188.90 ± 16.30#	125.52 ± 16.06#	129.17 ± 12.85#
辛伐他汀组	148.63 ± 11.22#	106.39 ± 16.63#	102.95 ± 12.91#
F 值	74.859	73.256	77.270
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 与空白对照组比较, *P < 0.05; 与模型组比较, #P < 0.05

表 4 各组小鼠主动脉壁组织中 visfatin 水平比较($\bar{x} \pm s$, n=8)

Table 4 Comparison of the expression level of visfatin in each group

组别	相对灰度值
空白对照组	0.392 ± 0.064
模型组	1.234 ± 0.071*
丹参酮高剂量组	0.804 ± 0.105#
丹参酮低剂量组	1.007 ± 0.115#
辛伐他汀组	0.899 ± 0.081#
F 值	97.426
P 值	0.000



注: A. 空白对照组; B. 模型组; C. 丹参酮 II A 高剂量组; D. 丹参酮 II A 低剂量组; E. 辛伐他汀组。

图 2 各组小鼠主动脉壁组织中 visfatin 表达

Figure 2 Expression level of visfatin in arterial wall tissue in each group

2.5 Visfatin 表达与血清 CRP、TNF-α、MMP-9 水平的相关性分析 多元直线回归分析显示, ApoE^{-/-}小鼠主动脉壁 Visfatin 表达水平与血清 hs-CRP、TNF-α、MMP-9 水平均具有显著的正相关关系 (Pearson 相关系数分别为 0.828, 0.898, 0.811, P 均等于 0.000)。

3 讨论

动物模型的建立是研究疾病病因、发病机制和防治的工作基础。apoE 基因缺陷 C57BL/6 小鼠是最易形成 AS 的小鼠品系^[5-6], 可以形成接近于人类的动脉

粥样硬化。由于脂质代谢紊乱是造成 AS 发生的重要因素, 故本研究利用 C57BL/6 apoE 基因敲除小鼠, 并同时给予高脂饮食饲养, 成功建立了动脉粥样硬化模型。

动脉粥样硬化发生发展中, 炎症反应是一个复杂的网络调控过程。冠心病患者血浆中 hs-CRP、TNF-α、MMP-9 等炎症介质升高^[7], 而且这些炎症介质与粥样斑块不稳定和破裂密切相关, 在一定程度上反应了心血管病临床事件的危险程度^[8-10]。Visfatin 是由内脏脂肪细胞分泌的脂肪细胞因子。多名学者^[11-12]临床研究发现, 冠心病患者血清 visfatin 水平显著升高, 且冠心病病变程度愈重, visfatin 水平愈高。Dahl 等人进一步研究发现, Visfatin 大量表达于动脉粥样硬化斑块的巨噬细胞中, 可能参与斑块发展进程^[13], 故建议将 PBEF/visfatin 定义为介导心血管病改变的炎症因子。

在本研究中, 空白对照组野生型 C57BL/6J 小鼠主动脉未见明显动脉粥样硬化改变, 模型组 apoE^{-/-}小鼠有显著的主动脉内膜增厚及粥样斑块的形成, 伴随主动脉壁组织中 visfatin 显著高表达, 表明 visfatin 确实通过某种途径参与动脉粥样硬化病变过程。

在本实验研究中, 模型组 visfatin 高表达伴 TC、TG、LDL-C 显著增高, 其可能机制为 visfatin 可促进小鼠皮下与肠系膜原代前脂肪细胞对葡萄糖的利用转化为甘油三酯, 促进甘油三酯的聚集。此外模型组 visfatin 显著高表达伴有 hs-CRP、TNF-α、MMP-9 炎症介质的升高, 且相关分析表明, visfatin 表达水平与血清 hs-CRP、TNF-α、MMP-9 水平均存在显著的正相关关系, 提示 visfatin 可作为一个促炎症反应因子, 与炎症介质存在交互作用, 从而促使平滑肌细胞增生和内皮通透性增加导致血管病变。

丹参是临床最常用的活血化瘀中药, 是经典的二萜醌类化合物。本研究建立了动脉粥样硬化动物模型, 以动脉粥样硬化炎症和脂质代谢异常为出发点, 以抑制炎症介质和调脂为准绳, 探讨丹参酮 II A 在此过程中的作用。结果表明: 丹参酮 II A 可显著降低主动脉壁 visfatin 表达, 显著改善血清脂质紊乱和降低炎症因子 hs-CRP、TNF-α、MMP-9 水平, 具有显著的抑制动脉粥样硬化发生作用。由于炎症介质的激活是导致动脉粥样硬化发生之关键所在, 因此推论丹参酮 II A 可通过抑制 visfatin 表达的激活途径, 从而抑制炎症介质的表达而实现对动脉粥样硬化多靶点的调控作用。相对于辛伐他汀抗动脉粥样硬化作用而言,

丹参酮 II A 高剂量(20 mg·kg⁻¹)下调主动脉壁 visfatin 表达显著优于辛伐他汀组,这种抑制作用与抑制 hs-CRP、TNF- α 、MMP-9 炎症介质的激活作用一致。此外,丹参酮 II A 在体内达到治疗浓度后,具有广泛的心血管活性,如舒张血管、保护心肌、抗氧化、抗凝和保护内皮细胞等^[1,11]。

目前,对于 visfatin 调控炎症反应的具体机制尚未深入研究。已有的研究表明 P38、ERK 和 JNK 三种通路均参与了炎症因子表达调控和 AS 的病理过程。visfatin 作为一种与炎症有关的脂肪细胞因子,其表达是否受 MAPKs 信号分子的调节,或者是 visfatin 本身是否可以激活 MAPKs 信号通路,目前还不清楚,visfatin 在炎症调控网络中所处的位置和作用有待阐明。

参考文献:

- [1] 杨涓,董江川,李大主,等. 丹参酮 II A 磺酸钠对冠心病患者血小板功能的影响[J]. 中医杂志, 2013, 54(15): 1294-1296.
- [2] 黄方,潘士勇,张兴虎,等. 丹参酮 II A 磺酸钠治疗高龄老年人冠心病临床观察[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(2): 150-151.
- [3] Bresolin AC, Pronsatti MM, Pasqualotto LN, et al. Lipid profiles and inflammatory markers after periodontal treatment in children with congenital heart disease and at risk for atherosclerosis[J]. Vasc Health Risk Manag, 2013, 9: 703-709.
- [4] Wang P, Vanhoutte PM, Miao CY. Visfatin and cardio-cerebro-vascular disease[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2012, 59(1): 1-9.
- [5] Knouf C, Hinsdale ME, Mezdour H, et al. apoE structure determines VLDL clearance and atherosclerosis risk in mice [J]. J Invest, 1999, 103(11): 1579-1586.
- [6] 刘录山,唐志晗,任重,等. 3 种动物模型与动脉硬化粥样硬化病变病理形态学分析[J]. 南华大学学报, 2009, 37(2): 123-125.
- [7] Hamirani YS, Pandey S, Rivera JJ, et al. Markers of inflammation and coronary artery calcification: a systematic review[J]. Atherosclerosis, 2008, 201(1): 1-7.
- [8] Matsuda A, Morita H, Unno H, et al. Anti-inflammatory effects of high-dose IgG on TNF- α -activated human coronary artery endothelial cells[J]. Eur J Immunol, 2012, 42(8): 2121-2131.
- [9] MWågsäter D, Zhu C, Björkegren J, et al. MP-2 and MMP-9 are prominent matrix metalloproteinases during atherosclerosis development in the Ldlr (-/-) Apob(100/100) mouse[J]. Int J Mol Med. 2011, 28(2): 247-253.
- [10] Robertson L, Grip L, Mattsson Hultén L, et al. Release of protein as well as activity of MMP-9 from unstable atherosclerotic plaques during percutaneous coronary intervention[J]. J Intern Med. 2007, 262(6): 659-667.
- [11] Liu SW, Qiao SB, Yuan JS, et al. Association of plasma visfatin levels with inflammation, atherosclerosis and acute coronary syndromes (ACS) in humans[J]. Clin Endocrinol, 2009, 71(2): 202-207.
- [12] Lu LF, Wang CP, Yu TH, et al. Interpretation of elevated plasma visfatin concentrations in patients with ST-elevation myocardial infarction[J]. Cytokine, 2012, 57(1): 74-80.
- [13] Dahl TB, Yndestad A, Skjell and M, et al. Increased expression of visfatin macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization[J]. Circulation, 2007, 115: 972-980.
- [14] 柏承文,黄志军,朱信云,等. 丹参酮 II A 磺酸钠治疗冠心病心绞痛效果分析[J]. 中国实用医药, 2009, 4(3): 18-19.

(编辑:修春)

金荞麦提取物对慢性阻塞性肺病大鼠血清细胞因子及肺组织病理形态学的影响

唐艳芬¹, 高 想¹, 蒋凤荣², 郭 胜¹, 尤菊松¹, 朱金凤¹, 苏成程¹(1. 南京中医药大学南通附属医院, 江苏南通 226001; 2. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 观察金荞麦提取物对慢性阻塞性肺病(COPD)大鼠模型的作用及机制。**方法** 水提和醇提法制备金荞麦提取物;改良烟熏法复制 SD 大鼠 COPD 模型,实验分为正常组,模型组,金荞麦水提取物低、高剂量组,金荞麦醇提取物低、高剂量组。药物干预后,放射免疫法测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、Ⅲ型前胶原肽(PⅢ)、转化生长因子(TGF- β_1)含量的变化,光镜观察肺组织病理形态学。**结果** 模型组大鼠血清 TNF- α 、IL-6、IL-8、PⅢ、TGF- β_1 含量较正常组明显升高($P<0.01$),肺组

收稿日期: 2013-12-11

作者简介:唐艳芬,女,主任医师,研究方向:慢性阻塞性肺病。Email: tangyf@medmail.com.cn。通讯作者:高想,主任中医师,研究方向:心肺血管病。Email: gaoxiang@medmail.com.cn。

基金项目:江苏省中医药局中医药科技专项(LB09113)。