

脑栓通胶囊对动脉粥样硬化小鼠血脂水平的影响^{*}

刘婷婷¹ 孙芳玲¹ 赵学庆² 郑文荣¹ 田欣¹ 祝自新¹ 郭德玉¹ 王文¹

(1.首都医科大学宣武医院实验动物室,北京市老年病医疗研究中心,北京 100053)

(2.北京理工大学生命学院,北京 100081)

摘要:目的 观察脑栓通胶囊对动脉粥样硬化小鼠血脂水平的影响,探讨脑栓通胶囊治疗脑卒中的机制。方法 6周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠,采用高脂饮食法建立动脉粥样硬化模型,造模成功后随机分为模型组、脑栓通胶囊低剂量组、脑栓通胶囊高剂量组。低剂量组给予脑栓通胶囊 0.5 g/kg 体质量,高剂量组给予脑栓通胶囊 1.0 g/kg 体质量,对照组给予等量的蒸馏水。连续给药 12 周后腹主动脉取血,分离血清。酶偶联比色法测定血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein-cholesterol, HDL-C) 水平。结果 与模型组相比,脑栓通胶囊低剂量组和高剂量组均显著降低血清中 TC、TG 和 LDL-C 的含量,但对 HDL-C 含量无影响。结论 脑栓通胶囊可以调节血脂水平,其治疗脑卒中的作用机制很可能与该途径有关。

关键词:动脉粥样硬化;ApoE^{-/-}小鼠;脑栓通胶囊;血脂水平

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)06-0001-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.06.001

脑栓通胶囊由蒲黄、赤芍、郁金、漏芦、天麻五味药材组成,可以起到活血通络、祛风化痰的作用,是临床治疗缺血性中风病常用的中成药。君药蒲黄活血化瘀、通达血脉;臣药赤芍凉血行血、祛瘀破积;郁金行气解郁,清气化痰、解气痰火郁遏;佐药天麻熄风止痉、通络化痰;漏芦清解郁热、祛瘀通脉。临床治疗效果显示其可以改善脑梗死患者运动功能,降低炎症反应,改善脑梗死患者脑血流储备能力及血管弹性功能^[1-6],虽然脑栓通胶囊在临床应用过程中具有良好的治疗效果,但是其治疗作用的相关机制并不清楚,且少有相关的基础理论研究报道。ApoE 基因是一种负责包装、运输和处理胆固醇与其他脂类的载脂蛋白,可调节脂质代谢,维持胆固醇代谢平衡,是脂类代谢和心血管疾病的决定因子,缺乏 ApoE 会引起血浆内富含胆固醇的物质累积。ApoE 基因敲除小鼠于 1992 年培育成功^[7-8]。这种实验小鼠可以在正常或高脂饮食喂养的情况下,形成严重的高血脂症并引发动脉粥样硬化病灶。ApoE^{-/-}小

鼠的动脉粥样硬化形成呈慢性、自发性、进展性、连续性、广泛性,在很大程度上与人类动脉粥样硬化形成相似,是探讨动脉粥样硬化发生发展的可靠模型^[9]。本课题采用动脉粥样硬化 ApoE^{-/-}小鼠模型,研究脑栓通胶囊对血脂水平的调节作用,探讨脑栓通胶囊治疗缺血性脑卒中的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级别 6 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠 (品系: C57BL/6 J),北京大学医学部 (实验动物科学部) 提供。动物生产许可证: SCXK (京) 2016-0010,合格证号 NO. 11804700015074,动物使用许可证: SYXK (京) 2015-0016。

1.2 药物与试剂

脑栓通胶囊由广东华南药业有限公司生产 (国药准字 Z20040093)。总胆固醇 (TC) 试剂盒

收稿日期: 2019-06-24

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81573633)

作者简介: 刘婷婷 (1988—), 女, 博士, 研究实习员, 研究方向: 神经药理. E-mail: liuting_416@126.com

通信作者: 王文 (1968—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 神经药理、中药药理. E-mail: lzwang@163.com

(A111-1)、甘油三酯(TG)测试盒(A110-1)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测试盒(A112-1)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测试盒(A113-1)购自南京建成生物工程研究所。

1.3 主要仪器

全波长酶标仪(Multiskan Spectrum, 美国 Thermo Fisher 公司)。

1.4 方法

1.4.1 实验动物分组及给药: ApoE^{-/-}小鼠适应性饲养1周后,给予高脂饮食喂养(含0.15%胆固醇、21%脂肪),建立动脉粥样硬化模型^[10-11],在喂养过程中,随机抽取小鼠,取其主动脉弓,进行油红O染色,观察有无斑块形成的情况,判断 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化发展程度确定造模是否成功。高脂饲料喂养12周后,随机分为模型组、低剂量组和高剂量组,每组7只小鼠。低剂量组给予脑栓通胶囊0.5 g/kg体重,高剂量组给予脑栓通胶囊1.0 g/kg体重,对照组给予等量的蒸馏水,连续给药12周,每天给药1次。

1.4.2 血样采集及生化分析:小鼠用10%水合氯醛麻醉后,剪开下腹腔,暴露腹主动脉,取血0.5~1.0 mL。室温静置2 h。放入离心机,3 000 r/min,4℃离心20 min,取上清,检测TC、TG、HDL-C、LDL-C等生化指标。

1.5 统计方法

实验数据采用SPSS17.0软件进行统计,结果以($\bar{x} \pm s$)表示。用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)进行组间样本均数比较, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

2 结果

2.1 脑栓通胶囊对 ApoE^{-/-}小鼠总胆固醇含量的影响

总胆固醇是指血液中的所有脂蛋白所含胆固醇的总和,是反应血脂水平的重要指标之一。结果显示,与模型组比较,脑栓通小剂量组和脑栓通大剂量组的TC水平显著降低且有统计学意义($P < 0.01$, $n = 7$)(图1)。

2.2 脑栓通胶囊对 ApoE^{-/-}小鼠甘油三酯含量的影响

甘油三酯是长链脂肪酸和甘油形成的脂肪分子,是人体含量最多的脂类,其水平高低与动脉粥样

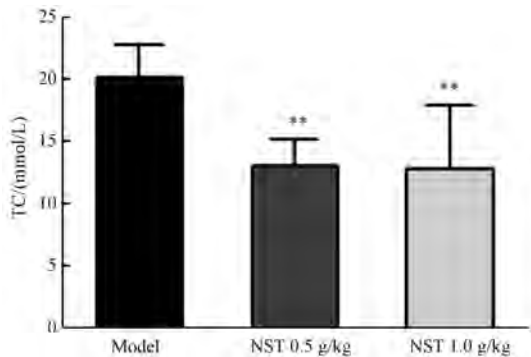


图1 脑栓通胶囊(NST)对 ApoE^{-/-}小鼠血清中总胆固醇含量的影响

注:与模型组相比, ** $P < 0.01$

Fig.1 Effect of Naoshuantong capsule (NST) on serum total cholesterol (TC) in ApoE^{-/-} mice

Note: compared with the model group, ** $P < 0.01$

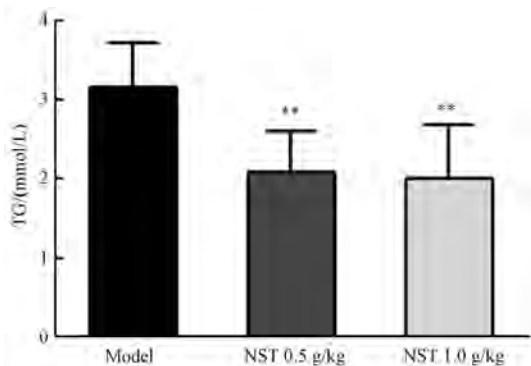


图2 脑栓通胶囊(NST)对 ApoE^{-/-}小鼠血清中甘油三酯含量的影响

注:与模型组相比, ** $P < 0.01$

Fig.2 Effect of Naoshuantong capsule (NST) on serum triglyceride (TG) in ApoE^{-/-} mice

Note: compared with the model group, ** $P < 0.01$

硬化程度密切相关^[12]。根据血清生化分析结果显示(图2),与模型组相比,脑栓通胶囊小剂量组和脑栓通胶囊大剂量组均能显著降低血浆中的TG的含量,差异有统计学意义(** $P < 0.01$, $n = 7$)。

2.3 脑栓通胶囊对 ApoE^{-/-}小鼠低密度脂蛋白胆固醇含量的影响

低密度脂蛋白胆固醇高于正常水平时,易聚集于大中动脉分支及弯曲处,与动脉粥样硬化的生成有直接关系^[13]。与模型组比较,脑栓通胶囊小剂量组LDL-C水平显著降低,有统计学差异(** $P < 0.01$, $n = 7$);脑栓通胶囊大剂量组LDL-C水平显著降低,有统计学差异(** $P < 0.001$, $n = 7$)(图3)。

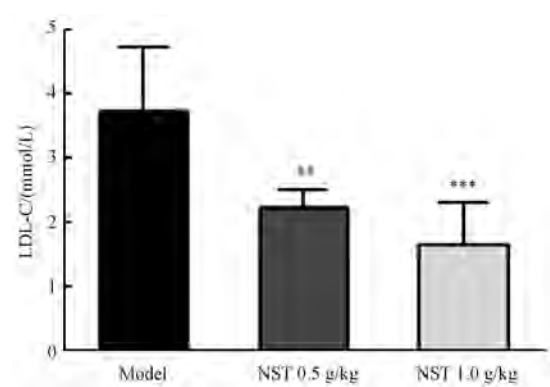


图 3 脑栓通胶囊 (NST) 对 ApoE^{-/-} 小鼠血清低密度脂蛋白胆固醇含量的影响

注:与模型组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Fig.3 Effect of Naoshuantong capsule (NST) on serum low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) in ApoE^{-/-} mice

Note: compared with the model group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

2.4 脑栓通胶囊对 ApoE^{-/-} 小鼠高密度脂蛋白胆固醇含量的影响

高密度脂蛋白胆固醇是一种抗动脉粥样硬化的脂蛋白,可将胆固醇从肝外组织转运到肝脏进行代谢,由胆汁排出体外^[14]。实验结果表明(图 4),与模型组比较,脑栓通胶囊小剂量组和脑栓通胶囊大剂量组的血清 HDL-C 水平没有明显差异($P>0.05$, $n=7$)。

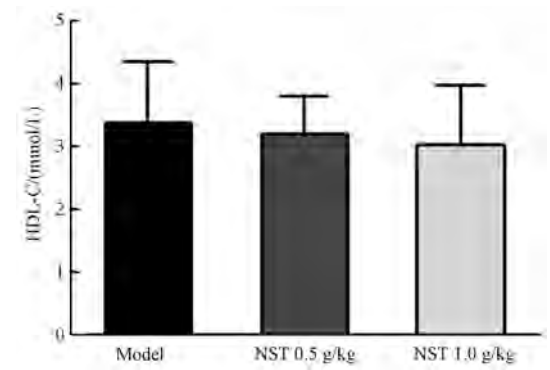


图 4 脑栓通胶囊对 ApoE^{-/-} 小鼠血清高密度脂蛋白胆固醇含量的影响

Fig.4 Effect of Naoshuantong capsule (NST) on serum high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) in ApoE^{-/-} mice

3 讨论

动脉粥样硬化是脑卒中及外周血管疾病的主要病理基础,而脂质代谢紊乱是动脉粥样硬化的一个重要因素。高血脂症中大量脂质进入血管内膜下引发免疫炎症反应,导致血管内皮细胞损伤,血浆脂蛋

白进入血管内膜,引起巨噬细胞吞噬反应、血管平滑肌细胞增生,形成斑块,斑块堵塞脑血管,则引发脑卒中^[15]。脑栓通胶囊是临床用于治疗脑卒中的中药复方制剂,且疗效显著,但其具体的作用机理并不清楚。ApoE 蛋白是清除乳糜微粒和极低密度脂蛋白受体的配体。存在于多种脂蛋白颗粒中,可运载内源性和外源性胆固醇,在动脉粥样硬化中起保护作用,因此缺乏 ApoE 则导致血液循环中富含胆固醇的物质积累,形成动脉粥样硬化。ApoE 基因缺陷小鼠是由美国洛克菲大学和北卡罗莱那大学两处实验室运用胚胎干细胞基因敲除技术,于 1992 年培育成功^[7-8]。因为该小鼠能在自然饮食条件下形成动脉粥样硬化,并且其病理改变与人类极为相似,甚至能形成纤维斑块,广泛地用于动脉粥样硬化的药效与机制研究^[16-17]。本实验通过对动脉粥样硬化 ApoE^{-/-} 小鼠血脂水平的检测,探讨脑栓通治疗脑卒中的相关机制。TC 是指血液中各脂蛋白所含胆固醇的总和,结果显示,脑栓通胶囊小剂量组和脑栓通胶囊大剂量组均可降低 TC 含量。低密度脂蛋白以胆固醇为内核,含 4 536 个氨基酸残基的载脂蛋白 B₁₀₀ 覆盖于表面,借助非极性的疏水基团与内核相连。当血浆 LDL 水平高于正常时会集聚于大中动脉分支弯曲处,进入损伤血管内膜,氧化生成 Ox-LDL。Ox-LDL 可对内皮细胞结构和功能的完整性造成破坏,促进动脉内膜的脂质沉淀,是动脉粥样硬化的关键启动因素^[18-20]。研究结果显示,脑栓通小剂量组和脑栓通大剂量组可以显著降低 LDL-C 的水平。此后,研究人员又进一步观察了脑栓通胶囊对 HDL-C 的调节作用。HDL-C 参与胆固醇逆向转运,将巨噬细胞、血管平滑肌等肝外组织细胞内胆固醇携带至肝脏转化为胆汁酸或直接通过胆汁酸排出体外,从而减轻整体的脂质负荷^[13, 21],所以普遍认为 HDL-C 具有抗动脉粥样硬化作用。但 HDL-C 具有双重作用,其在生理状态下, HDL 的抗动脉粥样硬化功能占优势,处于主导地位。而在病理状态下, HDL-C 的结构成分会发生病理变化,其理化性质及功能状况相应改变,使 HDL-C 抗动脉粥样硬化作用减弱甚至逆转。本研究结果显示,与模型组相比,脑栓通胶囊给药组的 HDL-C 水平没有显著增加或减少,无统计学差异。提示脑栓通胶囊用于治疗动脉粥样硬化过程中可能和 HDL-C 水平无关。TG 是血浆中各脂蛋白所含脂肪的总和,其升高时胆固醇酯转移蛋白活性增加,促进 TG 含量在 HDL 及 LDL 中

表达增加,HDL 和 LDL 中的 TG 会被肝脂酶和脂蛋白脂酶进一步水解形成小而致密的 HDL 和 LDL 颗粒,LDL 颗粒则在血管壁沉积,促进动脉粥样硬化的发生^[22]。研究结果显示,脑栓通胶囊小剂量组和大剂量组均可显著降低 TG 的水平。

综上所述,脑栓通胶囊可以显著降低总胆固醇、低密度脂蛋白及甘油三酯的水平,从而减少动脉粥样硬化的发生发展,提示该途径可能是脑栓通胶囊治疗脑卒中的作用机制之一。

参考文献

- [1] 秦慧兵,刘红钊,张小林. 脑栓通胶囊治疗缺血性脑卒中临床研究[J]. 新中医, 2019, **51**(6):124-127.
- [2] 秦慧兵,刘红钊,张小林. 脑栓通胶囊治疗急性多发性脑梗死临床研究[J]. 新中医, 2019, **51**(4):127-129.
- [3] 向林. 脑栓通对急性脑梗死恢复期患者运动功能的影响研究[J]. 中国药业, 2017, **26**(1):66-68.
- [4] 彭蔚,周进,杨勇. 脑栓通胶囊对脑梗死患者脑血流储备的影响[J]. 中医临床研究, 2012, **4**(24):93-94.
- [5] 谭萍,郝勇,罗高权,等. 脑栓通胶囊对动脉粥样硬化患者血管弹性功能的影响[J]. 神经病学与神经康复学杂志, 2011, **8**(2):76-78.
- [6] 梁慧超,薛丽莉,谭燕萍. 脑栓通胶囊对脑梗死颈动脉粥样硬化斑块性质与血清脂联素、肿瘤坏死因子 α 、超敏 C 反应蛋白水平的影响[J]. 中国医院用药评价与分析, 2017, **17**(6):747-749.
- [7] Plump A S, Smith J D, Hayek T, *et al.* Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES Cells[J]. Cell, 1992, **71**(1):343-353.
- [8] Zhang S H, Reddick R L, Piedrahita J A, *et al.* Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E[J]. Science, 1992, **258**(5081):468-471.
- [9] 彭旷,杨永宗. 载脂蛋白 E 及其基因敲出小鼠的研究进展[J]. 心血管病学进展, 2016, **27**(suppl):74-78.
- [10] 左璇,罗金雀,姜新海,等. 小檗碱对 ApoE-/-小鼠动脉粥样硬化的影响及机制研究[J]. 药学学报, 2019, **54**(1):104-110.
- [11] 陈臻毅,徐强,梁自豪,等. 动脉粥样硬化发病机制及其动物模型研究进展[J]. 实验动物科学, 2015, **32**(4):54-58.
- [12] Tada H, Nohara A, Kawashiri M A. Serum Triglycerides and Atherosclerotic Cardiovascular Disease: Insights from Clinical and Genetic Studies[J]. Nutrients, 2018, **10**(11). pii: E1789.
- [13] 金超,曹中朝. 动脉粥样硬化相关因素研究进展[J]. 现代临床医学, 2016, **42**(3):166-169.
- [14] Barter P, Genest J. HDL cholesterol and ASCVD risk stratification: A debate[J]. Atherosclerosis, 2019, **283**:7-12.
- [15] Banerjee C, Chimowitz M I. Stroke Caused by Atherosclerosis of the Major Intracranial Arteries[J]. Circ Res, 2017, **120**(3):502-513.
- [16] Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis [J]. J Physiol Pharmacol, 2004, **55**(3):503-517.
- [17] 程军,李金平,田卓,等. ApoE 基因敲除小鼠和 C57BL/6J 小鼠血脂及主动脉组织病理学的对比观察[J]. 实验动物科学, 2008, **25**(2):4-6.
- [18] 王建礼,徐兴华,林娜. 氧化型低密度脂蛋白与动脉粥样硬化研究进展[J]. 医学综述, 2009, **15**(9):1307-1310.
- [19] Steinberg D. Atherogenesis in perspective: hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime[J]. Nat Med, 2002, **8**(11):1211-1217.
- [20] 陈玉成,梁玉佳,刘瑞,等. 氧化低密度脂蛋白对血管内皮细胞骨架的损伤及其机制[J]. 心血管康复医学杂志, 2004, **13**(4):320-321, 348.
- [21] 陈雅琴,赵水平. 高密度脂蛋白在动脉粥样硬化发病中的双重作用[J]. 医学与哲学, 2008, **29**(7):46-48.
- [22] 谢翔. 动脉粥样硬化患者甘油三酯升高的管理中国专家共识[J]. 中华全科医学, 2019, **17**(5):709-713.

(下转至第 8 页)

Establishment of Nucleic Acid Detection Method for Experimental Animal Ferret Aleutian Disease Virus

ZHAO Peng^{1,2}, GUO Zhi¹, TONG Wei¹, XIANG Zhiguang¹

(1. Institute of Laboratory Animal Science Chinese Academy Medicinal Science, Beijing 100021, China)

(2. Beijing City University, Beijing 100083, China)

Abstract: Objective To establish a PCR detection method for Aleutian virus for the detection of ferrets Aleutian virus in experimental animals. **Method** A pair of primers was designed with reference to the VP2 gene sequence of Aleutian disease virus in Genbank. The PCR method was established to test the specificity and sensitivity, and the experimental samples of ferrets feces were screened. **Result** The sequencing result showed that the designed primers can specifically amplify the 531 bp gene fragment of VP2 of Aleutian disease virus; There were no unspecific amplification when the following experimental animal DNA virus were used as templates in ADV PCR reaction: mouse Polyoma Virus, Minute virus of mice, Canine Parvovirus, Herpes Simplex virus, Ectromelia virus, Sendai virus, Mouse adenovirus; the nucleic acid plasmid with a sensitivity of 90.6 copy/ μ L was obtained. A total of 39 samples of ferrets were tested and no Aleutian virus nucleic acid was detected. **Conclusion** The current ADV PCR detection method shows applicable specificity and sensitivity, which can be used as a pathogen detection method in the screening of ferrets Aleutian disease virus in experimental animals.

Key words: Ferret; Aleutian disease virus; PCR; specificity; sensitivity

(上接第 4 页)

Influence of Naoshantong Capsule on Blood Lipid Levels in Atherosclerotic Mice

LIU Tingting¹, SUN Fangling¹, ZHAO Xueqing², ZHENG Wenrong¹,

TIAN Xin¹, ZHU Zixin¹, GUO Deyu¹, WANG Wen¹

(1. Department of Experimental Animal Center, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing Geriatric Medical Research Center, Beijing 100053, China) (2. College of Life Science, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Naoshuantong capsule on blood lipid levels in atherosclerotic mice and further explore its related mechanism of treatment on stroke. **Method** Six weeks old ApoE^{-/-} mice were fed with western diet for 12 weeks and randomly divided into three group: model group, Naoshuantong low dose group and Naoshuantong high dose group. The high and low dose group were given intragastric administration with 1.0 g/kg and 0.5 g/kg for 12 weeks, respectively. The model group was given normal saline of equal volume distilled water. After 12 weeks administration with Naoshuantong capsule, serum was collected from the abdominal aorta for lipid levels measurement. The levels of serum lipids TC, TG, LDL-C and HDL-C were detected by enzyme method. **Result** Compared with model group, Naoshuantong capsule low group and high group both could decrease the levels of TC, TG, LDL-C significantly, but there was no influence on HDL-C. **Conclusion** Naoshuantong capsule could regulate the level of blood lipid, and its mechanism of treating stroke may be related to this pathway.

Key words: Atherosclerosis; ApoE^{-/-} mice; Naoshuantong capsule; blood lipid level