

多廿烷醇抗动脉粥样硬化的分子机制研究

李晶晶,田乃亮,朱中生,陈绍良

(南京医科大学附属南京第一医院心内科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨多廿烷醇抗动脉粥样硬化的分子机制。方法:采用腹腔注射维生素 D₃+高脂饮食喂养 12 周,建立大鼠动脉粥样硬化模型,同时使用多廿烷醇对其进行干预。将 40 只 SD 大鼠随机平分成 4 组,为正常组、动脉粥样硬化组、阿托伐他汀组及多廿烷醇组。酶法(终点法/CHO-PAP Method)检测血清血脂水平,ELISA 法检测血清炎症因子超敏 C 反应蛋白(hs-CRP),取大鼠腹主动脉行电镜检查,采用 Western blot 法检测动脉粥样硬化斑块 p38MAPK 磷酸化的表达水平。结果:正常组可见完整内皮,动脉粥样硬化组大鼠腹主动脉有明显动脉粥样硬化形成,多廿烷醇组动脉粥样硬化程度较轻,大鼠血脂、血清 hs-CRP 炎症因子及大鼠腹主动脉 p38MAPK 磷酸化表达量均在正常组最低,动脉粥样硬化组最高,多廿烷醇组居中($P < 0.05$)。结论:多廿烷醇除了具有调脂作用外,可对动脉粥样硬化大鼠血清炎症因子 hs-CRP 和 p38MAPK 磷酸化有一定抑制作用,p38MAPK 磷酸化通路可能参与多廿烷醇抗动脉粥样硬化机制。

[关键词] 多廿烷醇;阿托伐他汀;动脉粥样硬化;p38MAPK 磷酸化

[中图分类号] Q592.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-650-05

Characterization of the molecular mechanism of the anti-atherosclerotic effect of policosanol in atherosclerosis rat

LI Jing-jing, TIAN Nai-liang, ZHU Zhong-sheng, CHEN Shao-liang

(Department of Vasculocardiology, Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To characterize the anti-atherosclerotic molecular mechanism of policosanol in atherosclerosis rat. Rat atherosclerosis model was prepared by intraperitoneal injection of vitamin D₃ with high cholesterol diet for 12 weeks. **Methods:** Forty SD rats were randomly divided into four groups: the normal group, atherosclerosis (AS) group, atorvastatin group and policosanol group. Serum lipids and serum inflammatory cytokine hs-CRP were detected enzymatically (end-point method/CHO-PAP method) and ELISA method, respectively. The atherosclerosis of the abdominal aorta was observed under an electron microscope. The expression of p-p38MAPK was analyzed by Western blot. **Results:** The normal group showed intact endothelium. AS formations were significantly greater in the AS group. The serum lipid levels, the content of serum inflammatory cytokines hs-CRP and the expression of p-p38MAPK in the policosanol group were between the AS group and the normal group, which were the highest in the AS group. **Conclusion:** Apart from its lipid-lowering effects, policosanol reduced the production of serum hs-CRP and inhibited the expression of p-p38MAPK in AS rats. The p38MAPK phosphorylation pathway may be involved in the anti-atherosclerosis molecular mechanism of policosanol in AS rats.

[Key words] policosanol; atorvastatin; atherosclerosis; p38MAPK phosphorylation pathway

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 650-654]

古巴生产的多廿烷醇是在 20 世纪 80 年代晚期由古巴科学家发现的,将甘蔗蜡经过有机溶剂的特殊处理,再皂化后提纯得到的含有 8 种长链脂肪伯醇^[1]的混合物,其中相对分子量为 410.5 的二十八烷醇含量最高^[2]。多廿烷醇作为一种新型调脂药,通过激活腺苷酸激酶(AMP-kinase)途径,抑制胆固醇合成中的关键酶——羟甲基戊二酰辅酶 A

(HMG-CoA)还原酶的活性,或增加其降解,从而抑制胆固醇合成,同时也通过增加低密度脂蛋白(LDL)受体的数量,增大 LDL 的血液清除率,促使血清中低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的降低。此外,多廿烷醇具有抗氧化作用,抑制血小板聚集,抑制平滑肌细胞增殖和内膜增生,稳定斑块,改善血管内皮功能,发挥抗动脉粥样硬化作用^[3-4]。动脉粥样

硬化是许多心血管疾病的病理基础,多因素多机制参与其中,其中“炎症学说”最广为接受。细胞炎症信号转导通路分别为:Janus 激酶-信号转导转录激活因子(JAK-STAT)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、核因子- κ B(NF- κ B)^[5],MAPK 家族信号通路主要包括 p38MAPK、细胞外信号调控的蛋白激酶(ERK)及 c-Jun N 端激酶(JNK)/应激激活的蛋白激酶(SAPK)信号通路,其中 p38MAPK 信号通路途径是控制炎症反应最主要的 MAPK 家族成员之一。研究证实,作为新型调脂药,多甘烷醇具有良好的安全性、耐受性及明确调脂作用^[6],而其抗炎机制目前仍有待进一步探讨。本实验通过建立大鼠动脉粥样硬化模型,多甘烷醇对大鼠动脉粥样硬化进行干预,探讨多甘烷醇抗动脉粥样硬化的抗炎机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

清洁级雄性 SD 大鼠 40 只,鼠龄 2 个月,体重 150~200 g (平均 180 g),南京医科大学附属南京市第一医院动物实验中心提供,多甘烷醇(古巴达尔码有限公司),阿托伐他汀钙片(美国默沙东公司),TRIzol(美国 Invitrogen 公司);大鼠超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)定量检测试剂盒(hs-CRP ELISA 试剂盒 96T,武汉 uscnlife 公司);蛋白提取试剂盒、蛋白浓度测定试剂盒及超敏 ECL 发光试剂盒(南京 Keygen 公司);大鼠源性 p-p38MAPK (美国 Cell Signal 公司),兔抗大鼠 β -actin(北京博奥森公司),酶标仪(Bio-Rad 680,美国伯乐公司),其他染色试剂及手术所用器械由南京医科大学设备中心代购。

1.2 方 法

1.2.1 分 组

SD 大鼠随机分为正常组、动脉粥样硬化组、多甘烷醇组及阿托伐他汀组,每组 10 只。正常组每日给予正常饮食及生理盐水灌胃,其他组在实验第 1 天给予腹腔注射维生素 D₃(600 000 U/kg),此后每天给予 20%高脂饮食(3.0%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧嘧啶、5.0%白糖、10.0%猪油、81.3%基础饲料),同时药物组给药量均为 10 mg/(kg·d),饲养 3 个月后予每只大鼠腹腔注射 10%的水合氯醛(0.3~0.4 ml/100 g)剂量麻醉后,将其仰卧固定在操作板上,剖开胸腹腔,暴露并分离出腹主动脉,用 10 ml 注射器沿着腹主动脉平行刺入,缓慢抽取 5~7 ml 动脉血,后置入普通采血管中冰上静置,4℃过夜后 1 200 r/min 离心 15 min,吸取上清液分成 2

份,分别检测血脂水平和血清炎症因子 hs-CRP 水平,剪取大鼠降主动脉后,将每只大鼠剩余主动脉全长分成 2 份,1 份置于 2.5%戊二醛中固定,行电镜检测,另 1 份置入冻存管后分组并迅速放入液氮罐中保存。

1.2.2 大鼠血脂水平检测

采用酶法(终点法/CHO-PAPMethod)检测血脂水平,包括总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、LDL-C。

1.2.3 ELISA 法检测大鼠血清炎症因子 hs-CRP

将各组血清从-80℃冰箱中取出,待 ELISA 试剂盒试剂降至室温时,配制标准品,将待测样品、空白对照品及标准品加入酶标板的孔中,根据说明书步骤进行孵育,并逐步加入 A、B 工作液及底物溶液,当标准孔前 3~4 个孔出现明显的梯度,后面 4 个孔没有明显的梯度时,即加入终止液终止反应,并立即将酶标板置于酶标仪测各孔光密度值。

1.2.4 大鼠降主动脉起始段电镜检测

剪取大鼠降主动脉起始段后迅速置于 2.5%戊二醛中固定,行透射电镜观察每组动脉粥样硬化情况。

1.2.5 Western blot 法检测 p38MAPK 磷酸化

使用蛋白提取试剂盒从液氮罐保存的主动脉组织中提取蛋白,测定各组蛋白浓度,12%丙烯酰胺凝胶行蛋白电泳,每孔加入 30 μ g 蛋白,浓缩胶 70 V,30 min,分离胶 120 V,1.0~1.5 h,电泳完毕后,行半干法转膜:15 V,45 min,取出其中 PVDF 膜,TBST(含 0.1% Tween 20 的 TBS)洗膜 1 次共 10 min,5%BSA(TBST 稀释)常温下封闭 2 h,分别加入兔抗大鼠 p-p38MAPK(1:2 000)或兔抗大鼠 β -actin(1:750)4℃孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,大鼠抗兔(1:1 000)二抗常温下孵育 2 h,TBST 洗膜 5 次,每次 10 min,暗室内给予 ECL 超敏发光试剂显色并用胶片显影、定影。每组实验至少重复 3 次。

1.3 统计学方法

所有数据应用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。各组大鼠血脂水平、大鼠血清炎症因子 hs-CRP 光密度值及 p38MAPK 磷酸化蛋白灰度值均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组间差异采用方差分析,两两比较使用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

实验过程中 4 组各死亡 2 只大鼠,均为灌胃死亡。

2.1 各组大鼠降主动脉起始段透射电镜检测结果

动脉粥样硬化组内皮细胞丢失,胶原纤维显著增多增粗,排列紊乱,有局灶性纤维溶解变性,内皮下有脂质样颗粒沉积,平滑肌细胞排列紊乱,线粒体肿胀,有早期动脉粥样硬化形成;正常组内皮保

持完整,平滑肌细胞排列紧密,胶原纤维无增生。多甘烷醇及阿托伐他汀组内皮细胞病变程度较轻,而多甘烷醇组较阿托伐他汀组可见更多胶原纤维形成,脂质沉积较多,提示多甘烷醇具有一定的抑制动脉粥样硬化作用(图 1)。

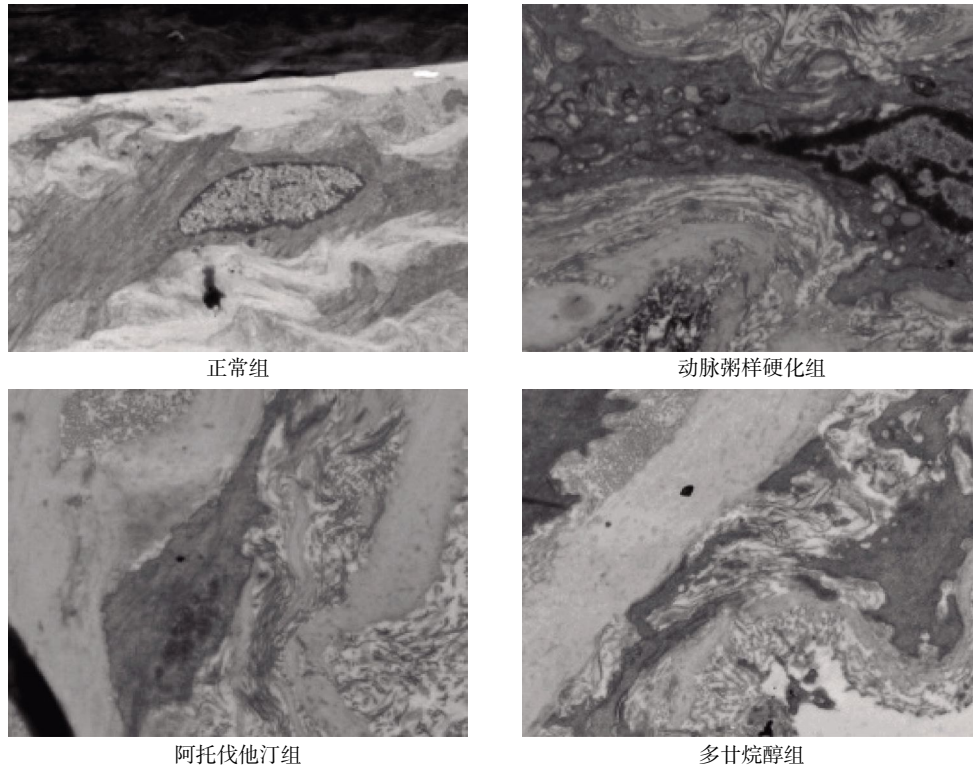


图 1 各组灌胃 3 个月后大鼠降主动脉起始段透射电镜图像(x 10 000)

Figure 1 TEM image of the origin of descending aorta 3 months after perfused(x 10 000)

2.2 各组大鼠血脂水平

多甘烷醇组、阿托伐他汀组和动脉粥样硬化组的 TC 及 LDL-C 均高于正常组,差异具有统计学意义($P < 0.05$,表 1),动脉粥样硬化组较正常组显著偏高提示高脂造模成功,多甘烷醇组 TC 低于动脉粥样硬化组,多甘烷醇组升高 HDL-C 作用较阿托伐他汀组强($P < 0.05$),降低 TC 及 LDL-C 作用较阿托伐他汀组无明显差别($P > 0.05$),提示多甘烷醇有降脂作用。

2.3 各组大鼠血清炎症因子 hs-CRP 水平

血清 hs-CRP 水平多甘烷醇组 (1.665 ± 0.056) pg/ml,阿托伐他汀组 (1.371 ± 0.070) pg/ml,AS 组 (1.976 ± 0.059) pg/ml,均高于正常组 (1.244 ± 0.073) pg/ml,差异具有统计学意义($P < 0.05, n = 8$),多甘烷醇组较阿托伐他汀组降低血清 hs-CRP 炎症因子作用较弱($P < 0.05$),提示多甘烷醇也可通过降低 hs-CRP 发挥抗炎作用。

2.4 各组大鼠主动脉起始段 p38MAPK 磷酸化的

Western blot 结果

p38MAPK 磷酸化蛋白含量表达量在动脉粥样硬化组最高,正常组最低,多甘烷醇组较动脉粥样硬化组及正常组 p38MAPK 磷酸化蛋白表达差异具有统计学意义($P < 0.05, n = 8$,图 2),可见多甘烷醇对 p38MAPK 具有一定的抑制作用。

3 讨论

动脉粥样硬化是许多心血管疾病的病理基础,多甘烷醇对动脉粥样硬化的调脂作用已为多个实验及临床证实,本实验初步探讨多甘烷醇对动脉粥样硬化的干预效果。

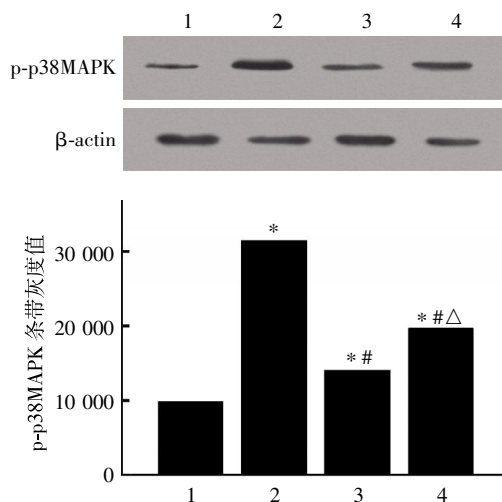
内皮细胞功能障碍是早期动脉粥样硬化过程中重要的病理生理变化。本实验通过维生素 D₃ 及高脂饮食喂养 3 个月后,成功建立大鼠动脉粥样硬化模型。根据电镜结果显示,动脉粥样硬化组有明显动脉粥样硬化形成,多甘烷醇组内膜损伤、脂质沉积及平滑肌紊乱较动脉粥样硬化组轻,提示多甘烷

表 1 各组灌胃 3 个月后大鼠血脂水平

Table 1 Comparison of blood-lipids level in rat after 3 months (mmol/L, n = 8, $\bar{x} \pm s$)

血脂水平	正常组	动脉粥样硬化组	阿托伐他汀组	多甘烷醇组
TC	1.023 ± 0.057	3.207 ± 0.321*	2.637 ± 0.163**	2.583 ± 0.128**
TG	0.985 ± 0.102	0.283 ± 0.028*	0.261 ± 0.032*	0.242 ± 0.030*
HDL-C	0.400 ± 0.031	0.542 ± 0.021*	0.580 ± 0.032*	0.601 ± 0.031* [△]
LDL-C	0.004 ± 0.006	0.570 ± 0.083*	0.447 ± 0.052*	0.436 ± 0.044*

与正常组比较, *P < 0.05; 与动脉粥样硬化组比较, **P < 0.05; 与阿托伐他汀组比较, [△]P < 0.05。



1: 正常组; 2: 动脉粥样硬化组; 3: 阿托伐他汀组; 4: 多甘烷醇组。与正常组比较, *P < 0.05; 与动脉粥样硬化组比较, #P < 0.05; 与阿托伐他汀组比较, [△]P < 0.05。

图 2 各组大鼠主动脉起始段 p38MAPK 磷酸化表达

Figure 2 Image of p38MAPK phosphorylation content in the origin of aorta

醇可能通过减轻内膜损伤,影响脂质沉积及平滑肌增殖,进而抑制动脉粥样硬化发展,与 Noa 等^[7]研究报道一致,其通过损伤兔子血管内膜模拟动脉粥样硬化早期改变,观察到多甘烷醇可减少内膜脱落,改善内皮功能,内膜增厚面积减少。动脉粥样硬化早期,通过保护内皮细胞,改善内膜功能,同时抑制脂质沉积和平滑肌增殖,可进一步发挥抗动脉粥样硬化作用。研究证实,多甘烷醇与他汀类调脂作用不同,主要通过以下两个途径:①在乙酸盐的消耗和甲羟戊酸的生成步骤中抑制胆固醇的生物合成;②通过增加肝细胞 LDL 受体数量,增加肝细胞对血液中 LDL 的摄取和代谢。本实验发现,动脉粥样硬化组血脂均显著高于多甘烷醇组、阿托伐他汀组和正常组(P < 0.05),多甘烷醇组降低 TC 及 LDL-C,升高 HDL-C 发挥调脂作用,与阿托伐他汀相比,多甘烷醇升高 HDL-C 作用更强(P < 0.05),这与 Castalfo 等^[8]报道大体一致,而在临床实验,王云等^[9]采用随机双盲阳性对照研究证实,10 mg/d 多甘烷

醇降脂效果与普伐他汀 10 mg/d 的疗效相当。因此,多甘烷醇具体调脂效果仍有待进一步临床验证。

动脉粥样硬化是慢性炎症反应过程,从脂质条纹到粥样斑块形成,始终都有各种炎症细胞和大量炎症介质参与,炎症反应伴随动脉粥样硬化发生发展。C 反应蛋白(CRP)是在炎症反应中继发于细胞因子增高而由肝脏合成的一种急性期蛋白。研究发现,冠心病患者血清 hs-CRP 水平显著高于正常对照组,且随着病情加重,血清 hs-CRP 水平呈上升趋势^[10-11]。冠心病患者血清 hs-CRP 水平的变化对冠心病的早期诊断和预后判断均有重要临床价值。丁亚媛等^[12]认为血中 hs-CRP 的浓度跟冠脉病变的程度有关,对冠心病的病变程度具有预测价值。动脉粥样硬化斑块中 CRP 与脂蛋白结合,激活补体系统,损伤血管内皮功能,同时刺激组织因子生成^[13],引发脂质沉积于血管壁,通过浸润聚集促进动脉粥样硬化发生^[14]。同时,控制细胞炎症反应的 p38MAPK 信号通路途径参与动脉粥样硬化炎症反应。Kawahara 等^[15]发现 CRP 可引起细胞氧化应激,导致血管内皮失调和损伤,诱导细胞炎症因子及组织因子释放,上调 PKC、p38MAPK 及 JNK 磷酸化,促进动脉粥样硬化炎症发展。同样的, Singh 等^[16]检测了 Wistar 大鼠体内 CRP 对氧化低密度脂蛋白(oxLDL)摄取和基质金属蛋白酶 9(MMP-9)生成的作用,发现 CRP 显著增加巨噬细胞对 oxLDL 的摄取,有助于泡沫细胞形成,同时增加巨噬细胞 MMP-9 活性,但可被 p38MAPK、ERK 和 NF- κ B 抑制剂阻断,均提示动脉粥样硬化炎症反应中 CRP 水平升高与 p38MAPK 信号通路激活有关。本实验发现,血清中 hs-CRP 水平和磷酸化 p38MAPK 含量同样在动脉粥样硬化组最高,正常组最低,多甘烷醇组居中,提示多甘烷醇可通过降低血清 hs-CRP 水平发挥抗炎抗动脉粥样硬化作用,而该作用较阿托伐他汀弱(P < 0.05),多甘烷醇可同时抑制血清 hs-CRP 因子和 p38MAPK 磷酸化表达,p38MAPK 磷酸化可能参与了多甘烷醇抗炎作用,而血清 hs-CRP 是否

通过 p38MAPK 信号通路促进动脉粥样硬化的炎症反应,仍需进一步研究。

由此可知,多甘烷醇在动脉粥样硬化中,可通过减少内膜损伤,降低血脂及血清炎症因子 hs-CRP 水平,同时可在一定程度上抑制 p38MAPK 磷酸化表达,减轻动脉粥样硬化炎症反应,进而发挥抗动脉粥样硬化作用,这为进一步研究其对动脉粥样硬化平滑肌增殖过程中 p38MAPK 信号通路的作用提供一定的理论基础。

[参考文献]

- [1] Mas R, Castano G, Fernandez J, et al. Long-term effects of policosanol on obese patients with type II hypercholesterolemia[J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2004, 13 (Supply): S102-S108
- [2] Menendez R, Marrero D, Mas R, et al. *In vitro* and *in vivo* study of octacosanol metabolism [J]. *Arch Med Res*, 2005, 36(2): 113-119
- [3] Castano G, Mas R, Arruzazabala ML, et al. Effects of policosanol and pravastatin on lipid profile, platelet aggregation and endothelium in older hypercholesterolemic patients [J]. *Int J Clin Pharmacol Res*, 1999, 19 (4): 105-116
- [4] Menendez R, Amor AM, Rodeiro I, et al. Policosanol modulates HMG-CoA reductase activity in cultured fibroblasts [J]. *Arch Med Res*, 2001, 32(1): 8-12
- [5] 李玉洁, 杨庆, 翁小刚, 等. 动脉粥样硬化炎症信号转导通路研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(7): 857-860
- [6] 胡大一, 丁荣晶. 新型调脂药——多甘烷醇临床应用评估[J]. *中国实用内科杂志*, 2009, 29(1): 17-19
- [7] Noa M, Más R, Lariot C, et al. Protective effect of policosanol on endothelium and intimal thickness induced by forceps in rabbits[J]. *J Med Food*, 2007, 10(3): 452-459
- [8] Castalfo G, Femández L, Mas R, et al. Comparison of the effects of policosanol and atorvastatin on lipid profile and platelet aggregation in patients with dyslipidaemia and type 2 diabetes mellitus [J]. *Clin Drug Investig*, 2003, 23 (10): 639-650
- [9] 王云, 柯元南, 王嘉莉, 等. 多甘烷醇与普伐他汀治疗高血脂症的疗效和安全性 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2008, 27(2): 124-128
- [10] Ridker PM, Paynter NP, Rifai N, et al. C-reactive protein and parental history improve global cardiovascular risk prediction; the Reynolds risk score for men [J]. *Circulation*, 2008, 118(22): 2243-2251
- [11] Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein [J]. *N Engl J Med*, 2008, 359 (21): 2195-2207
- [12] 丁亚媛, 杨志健, 贾恩志, 等. C反应蛋白含量与冠状动脉狭窄程度关系的研究 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2006, 26(6): 441-444
- [13] Verma S, Li SH, Badiwada MV, et al. Endothelin antagonism and interleukin-6 inhibition attenuate the proatherogenic effects of C-reactive protein [J]. *Circulation*, 2002, 105(16): 1890-1896
- [14] Han KH, Hong KH, Park JH, et al. C-reactive protein promotes monocyte chemoattractant protein-1-mediated chemotaxis through up-regulating CC chemokine receptor 2 expression in human monocytes [J]. *Circulation*, 2004, 109(21): 2566-2571
- [15] Kawahara K, Biswas KK, Unoshima M, et al. C-reactive protein induces high-mobility group box-1 protein release through activation of p38MAPK in macrophage RAW264.7 cells [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2008, 17 (3): 129-138
- [16] Singh U, Dasu MR, Yancey PG, et al. Human C-reactive protein promotes oxidized low density lipoprotein uptake and matrix metalloproteinase-9 release in Wistar rats [J]. *J Lipid Res*, 2008, 49(5): 1015-1023

[收稿日期] 2011-12-20