

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.24.008

黄芩苷对动脉粥样硬化模型大鼠 NF- κ B TAFI 及 ACE2 表达水平影响毕明辉^{1,2},程 诚^{1 Δ} ,李 鹏^{1,3},吴平生¹

(1. 南方医科大学研究生学院,广州 510515;2. 厦门市中医院心血管科,福建厦门 361009;

3. 中山大学附属第五医院内科,广东珠海 519000)

[摘要] **目的** 观察黄芩苷对动脉粥样硬化模型大鼠的主动脉壁细胞内核因子(NF- κ B)、纤溶抑制物(TAFI)及血管紧张素转换酶 2(ACE2)表达水平影响,探讨黄芩苷防治动脉粥样硬化机制。**方法** 选取健康雄性 Wistar 大鼠作为实验研究对象,分为 4 组,每组 10 只,为假手术组、模型组、黄芩苷高剂量组(黄芩苷 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、黄芩苷低剂量组(黄芩苷 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹),发色底物法测定血浆 TAFI 的活性,免疫组织化学法测定主动脉壁细胞内核因子 NF- κ B、ACE2 表达水平。**结果** 与假手术组相比,其余组大鼠 TAFI、ACE2 活性升高,NF- κ B 灰度值降低($P<0.05$);黄芩苷高、低剂量组 TAFI、ACE2 明显低于模型组,NF- κ B 高于模型组($P<0.05$)。**结论** 黄芩苷可能通过下调 TAFI 水平,NF- κ B 表达,上调 ACE2 表达,发挥其抗动脉粥样硬化作用。

[关键词] 黄芩苷;动脉粥样硬化;NF- κ B;TAFI;ACE2**[中图分类号]** R541.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)24-3334-03Effects of baicalin on the expression of TAFI, NF- κ B, and ACE2 in the atherosclerotic ratsBi Minghui^{1,2}, Cheng Cheng^{1 Δ} , Li Peng^{1,3}, Wu Pingsheng¹

(1. Graduated School of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Department of Cardiology, Traditional Chinese Medical Hospital of Xiamen City, Xiamen, Fujian 361009, China; 3. Department of Internal Medicine, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhuhai, Guangdong 519000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of baicalin on the expression of TAFI, NF- κ B, and ACE2 in the atherosclerotic rats and discuss the anti-atherosclerosis mechanisms of baicalin. **Methods** The subjects were healthy male Wistar rats. The rats were divided into sham operation group, model group, baicalin high dose group (150 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and baicalin low dose group (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹). Plasma TAFI activity were detected with enzymatic assays. The expression of NF- κ B and ACE2 were detected with immunohistochemical staining. **Results** Compared with sham group, the rest groups of TAFI and ACE2 activity were significantly higher ($P<0.05$), and the expression of NF- κ B, had significant decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the level of TAFI and ACE2 in baicalin drug group was significantly lower than the model group ($P<0.05$), and the expression of NF- κ B, had significant increased. **Conclusion** Baicalin can reduce TAFI and ACE2 level, and upregulate the expression of NF- κ B to play its role in anti atherosclerosis.

[Key words] baicalin; atherosclerosis; NF- κ B; TAFI; ACE2

近年来,心脑血管病的发病率逐年升高,其中由动脉粥样硬化引发疾病的病死率逐年上升,防治动脉粥样硬化,研究其病因、病理机制成为研究重点。研究表明,中药对动脉粥样硬化有显著防治作用,黄芩苷是从黄芩根中提取获得的黄酮类单体化合物^[1-2]。有研究表明,黄芩具有多种药理作用^[3-4],如抗氧化、抗炎、抑制平滑肌增殖、调节免疫等,黄芩苷亦具有多种药理作用,如调节血脂、恢复凝血-纤溶系统平衡等。但黄芩苷对于动脉粥样硬化的防治作用及其机制有待于进一步研究。本研究通过构建动脉粥样硬化大鼠模型,观察黄芩苷对动脉粥样硬化模型大鼠主动脉壁细胞内核因子(NF- κ B)、纤溶抑制物(TAFI)及血管紧张素转换酶 2(ACE2)表达水平影响,探讨黄芩苷防治动脉粥样硬化作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 Wistar 大鼠,雄性,体质量 250.0~350.0 g,适龄,健康,共 40 只,均购自南方医科大学实验动物中心,饲养在南方医院实验动物中心,饲养温度控制在 25℃,

湿度 7%,自动通风器保持室内通风。普通饲料及高脂饲料均购自广东省医学实验动物中心。

1.1.2 实验药物 黄芩苷(山东鲁抗大禹药业有限公司),TAFI 发色底物试剂盒(美国 DIAGNOSTICA 公司),维生素 D3(浙江仙琚制药股份有限公司,批号:国药准字 H20058981),其他试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及给药 购进 Wistar 大鼠后,先喂养 1 周普通饲料,后随机分为 4 组,每组 10 只,即假手术组、模型组、黄芩苷高剂量组、黄芩苷低剂量组。假手术组大鼠给予普通饲料,剩余组别大鼠给予高脂饲料喂养。实验第 7 天后大鼠进行主动脉球囊损伤手术^[5],在实验开始时于大鼠的右下肢肌内注射维生素 D3(针剂 30 万 U/kg),隔 1 个月肌内注射 1 次,周期 4 个月,建立动脉粥样硬化大鼠模型。假手术组、模型组大鼠肌内注射生理盐水 2 mL,每天 1 次;黄芩苷高剂量组肌内注射黄芩苷 150 mg·kg⁻¹·d⁻¹,每天 1 次;黄芩苷低剂量组肌内注射黄芩苷 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹,每天 1 次。给药 8 周

后,处死所有动物,发色底物法测定血浆 TAFI 的活性,免疫组织化学法测定 NF-κB、ACE2 表达水平。

1.2.2 测定血浆 TAFI 的活性 在给药第 8 周末,大鼠空腹 12 h 后,心脏取血,按照试剂盒步骤测定 TAFI 活性。

1.2.3 免疫组织化学法测定 测定 NF-κB、ACE2 表达水平:取血后,脱臼处死大鼠,取主动脉,置于 10% 甲醛溶液中,固定 24 h 后,取出、包埋、切片(4 μm),然后将组织切片置于涂有多聚赖氨酸的玻片上,37 °C 烤片,过夜,4 °C 保存备用。免疫组织化学操作步骤参考文献[6-7]方法。实验结果判定:NF-κB、ACE2 染色阳性细胞质中有棕黄色或者褐色颗粒。每只大鼠选取 4 张切片,每张切片随机选取 5 个视野(×200)阳性着色区域,然后采用图像软件测定阳性染色细胞棕色颗粒的平均吸光度值(OD 值)。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 黄芩苷对动脉粥样硬化模型大鼠血浆 TAFI 表达影响 实验过程中,各组大鼠采食饮水等活动均正常,毛色光亮柔滑,生命体征良好,饮食、毛色及外观未见明显异常。与假手术组比较,其余各组大鼠 TAFI 活性均明显升高($P < 0.05$);经过黄芩苷治疗后,黄芩苷高、低剂量组 TAFI 明显低于模型组($P < 0.05$),见表 1。

2.2 黄芩苷对动脉粥样硬化模型大鼠 NF-κB 表达水平影响 与假手术组比较,其余各组 NF-κB 明显降低($P < 0.05$);经过黄芩苷灌胃给药治疗后,与模型组比较,黄芩苷高、低剂量组 NF-κB 均明显升高($P < 0.05$),见表 1。

2.3 黄芩苷对动脉粥样硬化模型大鼠 ACE2 表达水平影响 与假手术组比较,其余各组 ACE2 活性明显升高($P < 0.05$);

经过黄芩苷灌胃给药治疗后,与模型组比较,黄芩苷高、低剂量组 ACE2 活性均明显降低($P < 0.05$),见表 1。

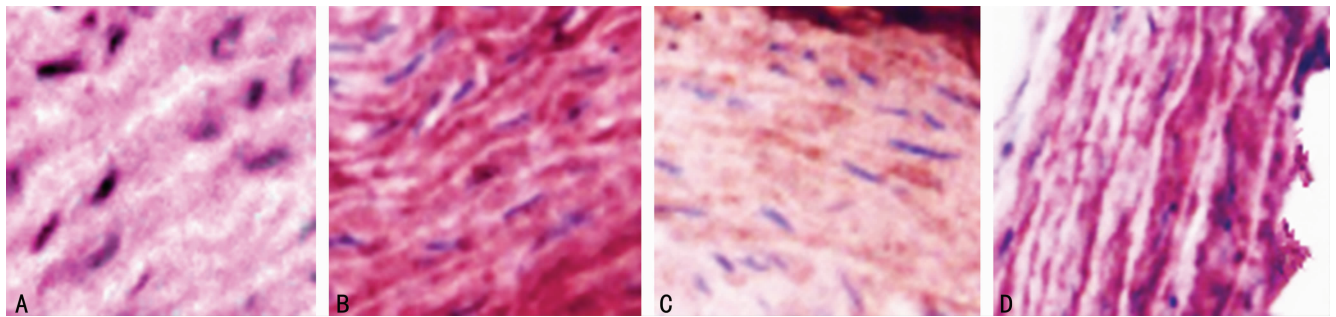
表 1 黄芩苷对动脉粥样硬化模型大鼠血浆 TAFI、NF-κB、ACE2 活性表达影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TAFI(μg/L)	NF-κB	ACE2 活性
假手术组	10	27.56 ± 0.10	167.52 ± 7.82	75.28 ± 7.32
模型组	10	34.38 ± 5.26 ^a	66.69 ± 9.26 ^a	148.63 ± 9.15 ^a
黄芩苷高剂量组	10	31.07 ± 2.53 ^{ab}	128.47 ± 8.45 ^{ac}	103.84 ± 8.53 ^{ab}
黄芩苷低剂量组	10	30.11 ± 1.74 ^{ab}	112.75 ± 9.14 ^{ab}	111.35 ± 8.46 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与假手术组比较;^b: $P < 0.05$,^c: $P < 0.01$,与模型组比较。

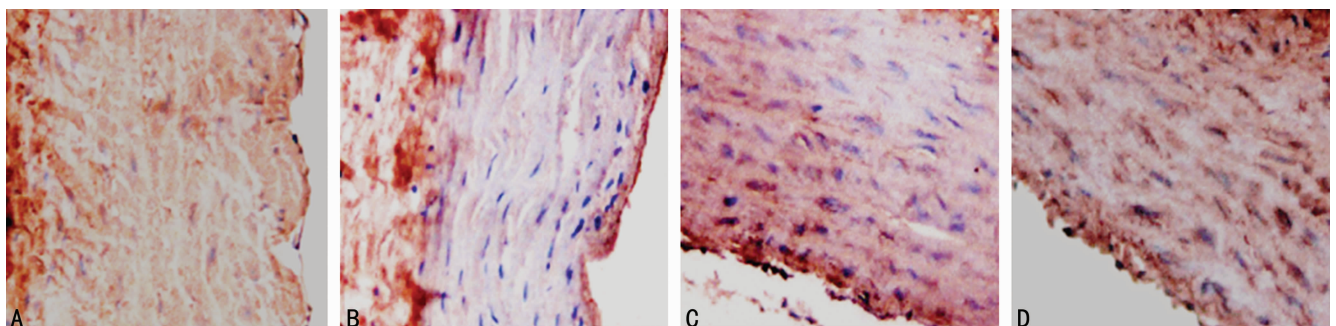
2.4 黄芩苷对大鼠主动脉免疫组织化学染色 NF-κB 表达的影响 大鼠主动脉 NF-κB 免疫组织化学染色,光镜下观察,假手术组 NF-κB OD 值为 0.100 ± 0.008;模型组 NF-κB 表达明显降低,OD 值为 0.350 ± 0.014,斑块内可见大量浅紫红色阳性颗粒;黄芩苷高剂量组 OD 值为 0.270 ± 0.010,NF-κB 表达明显增加,与模型组相比差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,黄芩苷低剂量组 NF-κB 的表达增加差异也有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

2.5 黄芩苷对大鼠主动脉免疫组织化学染色 ACE2 表达的影响 主动脉 ACE2 免疫组织化学染色,光镜下观察,假手术组 ACE2 OD 值为 0.120 ± 0.006。模型组 ACE2 表达明显增加,OD 值为 0.430 ± 0.020,斑块内可见大量棕黄色阳性颗粒,以细胞质为主,细胞核内有少量表达。黄芩苷高剂量组 OD 值为 0.230 ± 0.012,黄芩苷低剂量组 OD 值为 0.310 ± 0.011,ACE2 表达明显减少,与模型组相比差异都有统计学意义($P < 0.01$),见图 2。



A:假手术组;B:模型组;C:黄芩苷高剂量组;D:黄芩苷低剂量组。

图 1 黄芩苷对动脉粥样硬化模型大鼠 NF-κB 活性表达水平影响



A:假手术组;B:模型组;C:黄芩苷高剂量组;D:黄芩苷低剂量组。

图 2 黄芩苷对动脉粥样硬化模型大鼠 ACE2 活性表达水平影响

3 讨 论

目前关于动脉粥样硬化的发病机制尚未阐明,有研究报道,高血压、血脂异常、炎症、凝血-纤溶系统平衡失调是常见高危因素^[6]。因此,防治动脉粥样硬化,研究其病因、病理机制成为重点。有研究报道^[3-4],黄芩苷具有多种药理作用,尤其在调节血脂、恢复凝血-纤溶系统平衡等方面。本研究通过构建动脉粥样硬化大鼠模型,观察黄芩苷对动脉粥样硬化模型大鼠 NF- κ B、TAFI 及 ACE2 表达水平影响,探讨黄芩苷防治动脉粥样硬化作用机制。

有研究表明,肾素-血管紧张素-醛固酮系统在动脉粥样硬化发生、发展中具有重要作用,血管紧张素 II (Ang II) 水平通过提高基质金属蛋白酶活性,促进血管平滑肌迁移及促进合成炎症因子并激活炎症信号的传导通路等途径促进动脉粥样硬化斑块形成^[7]。ACE2 水解 Ang II 生成 Ang(1-7),水解产物具有强烈舒张血管效应,在炎症及血管平滑肌增殖等过程中可发挥有益效应。是心血管系统的保护因子。ACE2 通过降低 Ang II 水平,生成 Ang(1-7) 发挥舒张血管的作用。本研究结果表明,与假手术组相比,其余各组大鼠主动脉壁 ACE2 表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 经过黄芩苷治疗后,黄芩苷药物组 ACE2 表达水平与模型组比较,差异有统计学意义。与黄芩苷低剂量组比较,黄芩苷高剂量组 TAFI 改善更优。提示,黄芩苷可通过上调 ACE2 表达抗动脉粥样硬化。

肝脏可合成 TAFI, TAFI 是一种羧肽酶样活性蛋白,通常无活性。在体内纤溶酶、凝血酶等可激活 TAFI, 从而起到抗纤溶作用。有研究表明^[8], 在动脉粥样硬化发生、发展过程中, TAFI 水平随着动脉粥样硬化程度加重而升高,说明动脉粥样硬化中有 TAFI 参与。本研究结果表明,与假手术组相比,其余各组大鼠 TAFI 活性均明显升高 ($P < 0.05$); 经过黄芩苷治疗后,与模型组比较,黄芩苷药物组 TAFI 明显低于模型组 ($P < 0.05$)。与黄芩苷低剂量组比较,黄芩苷高剂量组 TAFI 改善更优。TAFI 主要作用于纤维蛋白羧基端,导致纤溶酶无法与纤维蛋白结合,抑制了纤溶活性,溶栓时间延长,血栓形成危险升高。

动脉粥样硬化发展过程中, NF- κ B 信号转导通路被激活,将会过量表达,调控黏附分子细胞因子、免疫受体、急性期蛋白等基因表达,在炎症反应中具有重要作用^[9-11]。本研究结果表明,与假手术组相比,其余各组大鼠主动脉壁细胞内核因子 NF- κ B 表达水平差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 经过黄芩苷治疗后,黄芩苷药物组 NF- κ B 表达水平与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与黄芩苷低剂量组比较,黄芩苷高剂量组 NF- κ B 表达差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

本研究结果显示,黄芩苷抗动脉粥样硬化机制可能通过下调 TAFI 水平,恢复凝血-纤溶系统平衡; 下调 NF- κ B 表达,减少炎症反应; 上调 ACE2 表达,舒张血管。综上所述,模型组大

鼠 TAFI、NF- κ B 表达水平明显升高, ACE2 表达水平明显降低,黄芩苷可能通过下调 TAFI、NF- κ B 表达,上调 ACE2 表达,发挥其抗动脉粥样硬化作用。

参考文献

- [1] 张颖,孙根义,刘寅. 冠状动脉粥样硬化与血脂代谢紊乱的因素分析[J]. 天津医药,2010,39(10):20-22.
- [2] 李岩,邝枣园,李明. 黄芩苷对脂多糖诱导巨噬细胞一氧化氮和一氧化氮合酶表达的影响[J]. 广东医学,2010,31(6):675.
- [3] Shimizu H, Hirose Y, Nishijima F, et al. ROS and PDGF-beta[corrected] receptors are critically involved in indoxyl sulfate actions that promote vascular smooth muscle cell proliferation and migration[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009,297(2):C389-396.
- [4] 于听,刘向群,陈焕芹,等. 黄芩苷对动脉粥样硬化大鼠凝血酶激活纤溶抑制物水平及血脂、凝血纤溶指标的影响[J]. 中国老年学杂志,2010,38(22):3299-3301.
- [5] 郭延松,吴宗贵,杨军柯,等. 三种大鼠动脉粥样硬化模型复制方法的比较[J]. 中国动脉硬化杂志,2003,11(5):465-469.
- [6] 李明,陈伟强,李岩. 黄芩苷对脂多糖诱导的巨噬细胞 NF- κ B 活化及炎症因子表达的影响[J]. 现代生物医学进展,2009(22):4219.
- [7] 李岩,李明,邝枣园. 黄芩苷对小鼠巨噬细胞环加氧酶-2 和前列腺素 E2 表达的影响[J]. 实用医学杂志,2009,25(24):4129-4131.
- [8] 刘利妍,刘向群,陈焕芹,等. 大鼠动脉粥样硬化形成过程中 TAFT 水平变化及作用机制[J]. 山东大学学报(医学版),2007,45(8):787-791.
- [9] Amaada C, Nahum Meller, Coleen A, et al. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008,28(5):812-819.
- [10] Montecucco F, Pende A, Mach F. The renin-angiotensin system modulates inflammatory processes in atherosclerosis: evidence from basic research and clinical studies [J]. Mediators Inflamm, 2009:752406.
- [11] 张曹进,陈富荣,单志新,等. 血管紧张素转换酶 2 基因型与厄贝沙坦改善高血压患者左室重构及功能的关系[J]. 中华高血压杂志,2008,16(12):1105-1110.

(收稿日期:2015-02-08 修回日期:2015-08-10)

《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号:ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读作者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读作者免费订阅。读作者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“Chongqing Medicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。