

高胆固醇血症大鼠自由基代谢紊乱及阿托伐他汀的干预作用

任天舒^{1,2}, 李林鹏¹, 姜远英^{1*} (1. 第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433 2. 沈阳军区总医院药剂科, 辽宁 沈阳 110016)

摘要 目的: 研究阿托伐他汀对高胆固醇血症大鼠低密度脂蛋白氧化修饰的干预作用。方法: 采用脂肪乳剂灌胃的方法建立高胆固醇血症大鼠模型, 30只 wistar大鼠随机分为对照组、模型组和阿托伐他汀(ATV)组(5 mg/kg·d), 每组 10只。给药 4周后, 采用酶法、ELISA等方法测定血清总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、氧化低密度脂蛋白(ox-LDL), 并计算(TC-HDL-c)/HDL-c和 LDL-c/HDL-c。结果: 模型组 TC、LDL-c (TC-HDL-c)/HDL-c、LDL-c/HDL-c、ox-LDL、MDA显著高于对照组, HDL-c、SOD显著低于对照组($P < 0.01$); 同模型组比较, 阿托伐他汀能够显著降低 TC、LDL-c、ox-LDL、MDA, 升高 HDL-c、SOD($P < 0.01$)。结论: 阿托伐他汀能够降低循环系统氧化低密度脂蛋白水平, 具有较好抗脂质过氧化的作用, 可能是其抗动脉粥样硬化机制之一。

关键词: 阿托伐他汀; 脂质过氧化; 低密度脂蛋白; 动脉粥样硬化

中图分类号: R543 R972⁺. 6 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2007)03-0143-03

Free radical metabolic disorder and intervention of atorvastatin on hypercholesterolemia rats

REN Tian-shu, LI Lin-peng, JIANG Yuan-ying (1. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Pharmacy, the General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT **Objective** To study the LDL oxidation in hypercholesterolemia rats and the effects of atorvastatin. **Methods** The experimental model of hypercholesterolemia was established in rats by ig fat emulsion. 30 wistar rats were subdivided randomly into the control group, the model group and the atorvastatin group (5 mg/kg·d). After 4 weeks, the serum TC, LDL-c, HDL-c, SOD, MDA, ox-LDL were detected by enzyme or ELISA methods. In addition, (TC-HDL-c)/HDL-c and LDL-c/HDL-c were calculated. **Results** Contrast with control group, LDL, LDL-c (TC-HDL-c)/HDL-c, LDL-c/HDL-c, ox-LDL, MDA were markedly higher while HDL-c and SOD were markedly lower in model group ($P < 0.01$). LDL, LDL-c (TC-HDL-c)/HDL-c, LDL-c/HDL-c, ox-LDL, MDA were markedly lower in ATV group than that in model group ($P < 0.01$); HDL-c and SOD were significantly higher in ATV group than that in model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Atorvastatin decreased blood lipid, inhibited the lipid peroxidation and the oxidative modification of LDL of rat serum. This result may be one of mechanisms in preventing atherosclerosis.

KEY WORDS atorvastatin; lipid peroxidation; low-density lipoprotein; atherosclerosis

高脂血症导致体内自由基代谢平衡失调, 低密度脂蛋白极易被自由基、脂质过氧化物修饰, 引起内皮损伤和泡沫细胞的形成, 从而加快动脉粥样硬化(AS)的发生^[1]。阿托伐他汀(atorvastatin)是目前应用最广泛的 HMG-CoA 还原酶抑制剂, 大多数研究已证明了其具有调脂抗 AS 等作用^[2], 但是对于高胆固醇血症大鼠循环系统氧化修饰低密度脂蛋白(ox-LDL)的干预作用国内未见报道。本实验考察了阿托伐他汀的调脂抗氧化作用, 特别是对氧化修饰低密度脂蛋白的影响, 以阐述其抗动脉粥样硬化

的机制。

1 材料和方法

1.1 动物、试剂和药物 雄性 wistar 大鼠 30 只, 体重 200 ± 10 g 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 合格证号: SCXK(沪)2003-0003 随机分成正常组(10只)和造模组(20只); 胆固醇、吐温-80及丙二醇购于国药集团化学试剂有限公司; 丙基硫氧嘧啶为南通市华峰化工有限责任公司原料药(质量标准符合 2000年版中国药典); 胆酸钠, 意大利进口分装; 阿托伐他汀(商品名立普妥), 辉瑞制药提供, 批号: 45837002 总胆固醇(TC)测定试剂盒购自上海名典生物工程公司; 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)、

作者简介: 任天舒(1980-), 女(汉族), 硕士研究生, 药师。

通讯作者: 姜远英, E-mail: Jiangyy01@yahoo.com.cn

高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-c)测定试剂盒购自日本协和株式会社; 超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL)测定试剂盒购自轩昊科技生物试剂有限公司 (美国 RAPID BD 公司产品)。

1.2 主要仪器 Multiskan MK3 酶标分析仪; Smart Spec 3000 紫外分光光度计; 日立 7600 生化分析仪; 恒温水浴锅; 漩涡混合器等。

1.3 实验方法 参考文献^[3]并加以改进制备高脂乳剂, 即 10% 胆固醇, 25% 猪油, 5% 白糖, 2% 胆酸钠, 1% 丙基硫氧嘧啶, 20% 吐温-80 造模大鼠灌胃高脂乳剂 10 mL/(kg·d), 1 周后同正常对照组比较血清总胆固醇显著升高, 提示造模成功, 再将其随机分为模型组和阿托伐他汀 (ATV) 组。正常对照组给予普通饲料; ATV 组灌胃高脂乳剂和 ATV 5 mg/(kg·d); HC 组灌胃高脂乳剂和相同体积羧甲基纤维素钠溶液, 连续给药 4 周。末次给药后, 禁食不禁水 12 h 眼眶取血, 离心后取血清进行生化指标的测定。

表 1 ATV 对高胆固醇血症大鼠血脂的影响 ($n = 10 \bar{x} \pm s$)

组别	TC (mmol/L)	LDL-c (mmol/L)	HDL-c (mmol/L)	(TC-HDL-c)/HDL-c	LDL-c/HDL-c
对照组	1.54 ± 0.05	0.17 ± 0.01	0.71 ± 0.04	1.16 ± 0.07	0.24 ± 0.03
模型组	10.39 ± 1.6 ¹⁾	2.85 ± 0.49 ¹⁾	0.55 ± 0.15 ¹⁾	15.94 ± 4.96 ¹⁾	4.66 ± 1.45 ¹⁾
ATV 组	6.23 ± 0.81 ²⁾	1.62 ± 0.23 ²⁾	0.85 ± 0.08 ²⁾	6.36 ± 0.83 ²⁾	1.91 ± 0.24 ²⁾

注: ¹⁾ $P < 0.01$ 与对照组比较; ²⁾ $P < 0.01$ 与模型组比较

表 2 ATV 对高胆固醇血症大鼠 ox-LDL、MDA 和 SOD 的影响 ($n = 10 \bar{x} \pm s$)

组别	OX-LDL ($\mu\text{g/dl}$)	MDA (nmol/ml)	SOD (U/ml)
对照组	118.35 ± 11.69	4.83 ± 0.61	144.98 ± 13.95
模型组	346.84 ± 31.74 ¹⁾	11.68 ± 1.89 ¹⁾	73.35 ± 13.57 ¹⁾
ATV 组	170.16 ± 14.28 ²⁾	7.5 ± 1.35 ²⁾	121.21 ± 9.52 ²⁾

注: ¹⁾ $P < 0.01$ 与对照组比较; ²⁾ $P < 0.01$ 与模型组比较

3 讨论

高脂血症是动脉粥样硬化的重要危险因素, 血脂渗入动脉壁并沉积在动脉内膜上, 动脉中层和内膜逐渐地都向管腔内突出, 再加上动脉壁病理变化, 就形成了粥样斑块^[4]。目前越来越多的学者认为 AS 不是单纯的由于脂质沉积所致, 而是多因素、多环节的作用造成的^[5]。脂质过氧化在动脉粥样硬化形成与发展过程中起着关键作用^[6]。

脂质过氧化是自由基诱导的链式反应, 自由基攻击生物膜磷脂中不饱和脂肪酸发生过氧化作用形成脂质过氧化物 (LPO), 最终降解成丙二醛 (MDA)、烷烃等终末产物。血脂升高时, 脂质过氧化作用增强, MDA 等毒性物质产生增多, 修饰 LDL

1.4 检测指标及测定方法 酶法测 TC、LDL-c、HDL-c; 黄嘌呤氧化酶法测 SOD; 硫代巴比妥酸法测 MDA; ELISA 法测 ox-LDL; 所有生化指标测定按试剂盒规范操作; 计算 (TC - HDL-c) / HDL-c 和 LDL-c / HDL-c。

1.5 统计学处理 运用 SPSS13.0 软件进行统计处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用方差分析。

2 结果

2.1 血脂指标 与对照组比较, 模型组 TC、LDL-c (TC - HDL-c) / HDL-c 和 LDL-c / HDL-c 显著升高, HDL-c 显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, ATV 可显著降低 TC、LDL-c (TC - HDL-c) / HDL-c 和 LDL-c / HDL-c 显著增加 HDL-c 水平 ($P < 0.01$), 见表 1。

2.2 MDA、SOD 及 ox-LDL 与对照组比较, 模型组 MDA、ox-LDL 水平显著升高, SOD 显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, ATV 可显著降低 MDA、ox-LDL, 显著增加 SOD 水平 ($P < 0.01$), 见表 2。

形成 ox-LDL。ox-LDL 激活细胞炎性因子引起内皮的损伤, 加快 AS 的发病进程^[8]。有研究指出, 降低 ox-LDL 的浓度能减少动脉粥样硬化和冠心病发病的危险, ox-LDL 的浓度也可以作为预测冠心病患者心血管事件的重要指标^[7]。

超氧化物歧化酶 (SOD) 是一种广泛存在于生物体内与细胞代谢密切相关的酶, 具有清除氧自由基和保护机体细胞免受自由基损伤的作用, 并且自由基引发脂质过氧化作用损伤抗氧化酶的活性所形成的恶性循环可能是动脉粥样硬化发病机理的另一重要环节^[9]。在病理条件下, SOD 清除氧自由基的能力降低, 可使氧自由基大量产生, 破坏细胞膜的生物功能与蛋白质中的肽键、氨基酸残基, 导致细胞损伤老化而致 AS。

本文证明了阿托伐他汀能够增强 SOD 活力, 从而增强机体清除自由基能力; 同时, 阿托伐他汀减少 MDA 和 ox-LDL 的生成, 延缓被氧化修饰的低密度脂蛋白对组织的损伤, 从始动环节抑制动脉粥样硬化斑块的形成。

(下转第 149 页)

2.3 胆宁片对CCl₄所致大鼠慢性肝损伤血液生化指标的影响 由表3可见:皮下注射25% CCl₄花生油溶液2 ml/kg 6周后,造成大鼠慢性肝损伤模型,其血液生化指标显示:模型组的总蛋白和白蛋白较空白对照组显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),血清转氨酶(ALT、AST)较空白对照组非常显著升高($P < 0.01$)。胆宁片各剂量组具有提高血清白蛋白和

总蛋白含量,降低血清ALT、AST含量的作用;与模型组比较,胆宁片中剂量能显著提高白蛋白含量($P < 0.05$),中、高剂量组能显著或极显著降低CCl₄致大鼠慢性肝损伤血清转氨酶(ALT、AST)的水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。阳性对照护肝片也有显著或极显著降低血清转氨酶的作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表3。

表3 胆宁片对CCl₄所致大鼠慢性肝损伤血液生化指标的影响($\bar{x} \pm sD, n=10$)

组别	剂量(g/kg)	总蛋白(g/L)	白蛋白(g/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)
空白对照组		44.42±5.01	27.58±2.11	1.65±0.16	34.9±8.3
模型组		39.11±8.03 ¹⁾	23.41±3.97 ²⁾	1.52±0.21	90.2±41.8 ²⁾
阳性药组	1.3	43.55±11.04	26.81±5.24	1.73±0.38	47.7±17.6 ⁴⁾
低剂量组	0.5	42.18±11.65	25.78±5.72	1.67±0.35	64.6±24.0
中剂量组	1.5	43.65±9.70	27.13±4.47 ³⁾	1.71±0.28	55.6±22.4 ³⁾
高剂量组	3	42.29±11.72	26.22±6.59	1.68±0.21	48.8±15.8 ⁴⁾

注: ¹⁾ $P < 0.05$ ²⁾ $P < 0.01$ 与空白对照组比较; ³⁾ $P < 0.05$ ⁴⁾ $P < 0.01$ 与模型组比较

2.4 胆宁片肝损伤组织形态学的影响 正常对照组鼠肝小叶结构正常,中央静脉位于肝小叶,周边肝细胞呈条索放射状排列,模型组大、小鼠肝细胞均有点、灶状坏死,重度的脂肪变性,有些大鼠肝脏出现纤维化形成的病理改变。胆宁片低、中、高剂量组及阳性对照护肝片组肝细胞有脂肪变性,但病变程度与模型组比较有所减轻。

慢性肝损伤的病理改变。提示胆宁片是具有较好肝保护作用的中药,但其作用机制还有待我们进一步的研究。

3 讨论

参考文献:

本试验通过复制D-氨基半乳糖所致小鼠急性肝损伤、四氯化碳所致大鼠慢性肝损伤模型,观察胆宁片对实验性急慢性肝损伤的预防及治疗的保护作用,结果表明胆宁片的高、中、低剂量组对D-氨基半乳糖所致小鼠急性肝损伤具有较好的保护作用,能明显降低D-氨基半乳糖引起的ALT、AST升高。胆宁片对由四氯化碳所致大鼠慢性肝损伤模型亦有较好的保护作用,组织病理学结果也说明胆宁片能明显改善急

[1] 施俊. 胆宁片临床新用[J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(5): 309.
 [2] 季光, 范建高, 陈建杰, 等. 胆宁片治疗非酒精性脂肪性肝病(湿热型)的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(6): 485.
 [3] 郭青龙, 郭殿武, 陈真. 茵栀黄注射液保肝作用的实验研究[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(6): 440.
 [4] 李瑞芬, 范玉明, 王希海. 茵栀黄注射液对大鼠实验性肝损伤的治疗作用[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(2): 23.
 [5] 卢春风, 陈廷玉, 王淑香, 等. 丹参与三七配伍对大鼠慢性肝损伤的作用[J]. 黑龙江医药科学, 2003, 26(5): 32.

收稿日期: 2006-10-23

(上接第 144 页)

参考文献:

[1] Jiall I, Devaa JS. The role of oxidized low-density lipoproteins in atherosclerosis[J]. J Nutr 1996; 126: 1053.
 [2] 江红, 吴永健. 阿托伐他汀治疗新进展[J]. 心血管病学进展, 2004, 25(5): 335
 [3] 倪鸿昌, 李俊, 金涌, 等. 大鼠试验性高脂血症和高脂血症性脂肪肝模型研究[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(6): 703
 [4] 赵水平, 王钟林, 陆宗良. 临床血脂学[J]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997: 1~283
 [5] Ross R. Atherosclerosis An inflammatory disease[J]. N Engl J

Med 1999; 340(2): 115
 [6] Libby P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Nature, 2002, 12(420): 868
 [7] Shimada K, Mokuno H, Matsunaga E, et al. Circulating oxidized low-density lipoprotein is an independent predictor for cardiac event in patients with coronary artery disease[J]. Atherosclerosis 2004; 174(2): 343.
 [8] Koiani K, Kondo A, Manabe M, et al. Determination of malondialdehyde-modified LDL (MDA-LDL) and its potential usefulness[J]. Rinsho Byori 1997; 45(1): 47.
 [9] 宁夏, 刘森. 超氧化物歧化酶与动脉粥样硬化性疾病[J]. 中国航天医药杂志, 2004(6): 74.

收稿日期: 2006-04-17