

安化黑茶对载脂蛋白 E 敲除小鼠动脉粥样硬化的影响

张文将^{1,2}, 易健¹, 贾平¹, 陈博威¹, 韩鹏鹏¹, 徐睿¹, 刘柏炎^{*1}

(1. 湖南中医药大学 第一附属医院, 湖南 长沙 410007; 2. 益阳医学高等专科学校, 湖南 益阳 413000)

摘要: 观察安化黑茶对载脂蛋白 E 敲除(APOE^{-/-})小鼠血清中血脂含量、氧化型低密度脂蛋白(OX-LDL)及相关炎症因子的影响,推测其干预 AS 的相关机理。选取 8 周龄雄性 APOE^{-/-}小鼠 55 只,持续西方饮食饲料喂养 13 周,同时选用 8 周龄的 C57 小鼠作为空白对照予以普通饲料喂养 13 周,13 周后随机抽取 5 只行 HE 染色,确定造模成功后根据体质量分层,然后随机分为模型组、阿托伐他汀组和安化黑茶高、中、低剂量组。造模成功的 APOE^{-/-}小鼠继续西方饮食饲料喂养 8 周,阿托伐他汀组予以 10 mg/(kg·d)药物进行灌胃干预,安化黑茶高、中、低剂量组分别予以 2.16、1.44、0.72 g/(kg·d)的剂量灌胃干预,空白组和模型组予以等剂量的生理盐水灌胃干预,以上药物连续干预 8 周。实验末各组小鼠摘眼球取血清用于血脂四项和相关炎症因子的指标检测,称取小鼠体质量、肝质量、腹部脂肪质量,计算肝指数;取小鼠主动脉用于 HE 染色形态学观察。阿托伐他汀和安化黑茶不同剂量组小鼠主动脉瓣膜附近的斑块显著低于模型组 ($P < 0.05$);安化黑茶不同剂量组小鼠的甘油三酯(TG)含量低于模型组 ($P < 0.05$);安化黑茶组小鼠的体质量、肝质量、脾质量、腹部脂肪质量、肝指数明显降于模型组 ($P < 0.05$);安化黑茶组小鼠血清中 OX-LDL、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、高敏感性 C-反应蛋白(hs-CRP)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)含量低于模型组 ($P < 0.05$)。安化黑茶干预 AS 形成的机理可能与降脂、抗炎、抗氧化相关。

关键词: 安化黑茶;载脂蛋白 E 敲除;白细胞介素-1 β ;单核细胞趋化蛋白-1;氧化型低密度脂蛋白;肿瘤坏死因子 α ;高敏感性 C-反应蛋白

中图分类号:R 285.5 文章编号:1673-1689(2020)04-0076-09 DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2020.04.011

Effect of Anhua Dark Tea on Atherosclerosis in Apolipoprotein E Knockout Mice

ZHANG Wenjiang^{1,2}, YI Jian¹, JIA Ping¹, CHEN Bowei¹, HAN Pengpeng¹, XU Rui¹, LIU Baiyan^{*1}

(1. The First Affiliated Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China; 2. Yiyang Medical College, Yiyang 413000, China)

收稿日期: 2018-12-10

基金项目: 湖南省科技计划项目(2018JJ2412);湖南省中医药科研计划项目(201870);湖南省教育厅科学研究项目(17B271)。

作者简介: 张文将(1986—),男,博士研究生,主要从事中医药研究。E-mail: 1126372680@qq.com

* 通信作者: 刘柏炎(1970—),男,博士,教授,博士研究生导师,主要从事中医药研究。E-mail: liubaiyan@126.com

Abstract: The study aimed to observe the effect of Anhua dark tea on serum lipids, OX-LDL and related inflammatory factors in APOE^{-/-} mice to speculate its anti-AS mechanism. Fifty-five eight-week-old male APOE^{-/-} mice were fed with western diet for 13 weeks continuously. Ten eight-week-old male C57 mice as normal group were fed with normal diet for 13 weeks continuously. After 13 weeks, five mice were randomly selected for HE staining to determine the model. Then the mouse were randomly divided into model group, atorvastatin group and high, medium and low doses of Anhua dark tea groups. They were given saline, atorvastatin and Anhua dark tea with doses of 10, 2.16, 1.44 and 0.72 g/ (kg·d) by gavage, respectively. The blank group were given equal doses of saline by gavage and the APOE^{-/-} mice continued to be fed with western diet for 8 weeks. At the end of experiment, the eyeball was taken for blood and the serum was separate for blood lipids and related inflammatory factors. The body, liver, spleen, and abdominal fat of the mice were weighed, and the liver index was calculated. The aorta of the mice were taken for HE staining. Compared with the model group, the aortic root plaques, the weights of body, liver, spleen, abdominal fat and liver index, the levels of TG, IL-1 β , MCP-1, OX-LDL, TNF- α , hs-CRP of Anhua dark tea groups were decreased significantly ($P<0.05$). In conclusion, the anti-AS mechanism of Anhua dark tea may be related to its lipid-lowering, anti-inflammatory and anti-oxidative capacities.

Keywords: Anhua dark tea, APOE^{-/-}, IL-1 β , MCP-1, OX-LDL, TNF- α , hs-CRP

据中国心脑血管病报告统计显示,心脑血管疾病已经占据中国城乡居民死亡的首位,近年居高不下且呈现上升趋势^[1]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是导致各种心脑血管疾病形成的重要病理学基础^[2],引起AS形成的具体机制目前尚不清楚,传统观念认为高脂血症、高血压和高血糖、抽烟及遗传因素的是诱发AS发生的危险因素,随着科学研究的逐步深入,越来越多的学者认为炎症与AS的发生密切相关^[3-4],炎症反应几乎参与了AS发生发展的全过程^[5],自从ROSS首先提出炎症学说以来,经过大量的临床和动物实验的验证,“炎症学说”目前已成为导致AS发生的主流学说之一。阿托伐他汀是临床上应用于治疗AS的常用药物,但是长期服用所带来的不良反应也限制了其的广泛应用。为此大量的科学家试图寻找一种能够降脂、抗炎、保护血管内皮细胞的药物或者药食同源的食物,以期从根本上抑制AS的发生发展。

中国茶文化源远流长,茶作为日常饮品,在人们的日常生活中具有举足轻重的作用。《本草拾遗》提出“茶为万病之药”的观点。绿茶富含茶多酚,茶多酚具有降脂、抗氧化、抗炎、改善血管内皮、增强一氧化氮产生的功能,从而起到较好的防治AS的作用^[6-9]。但是绿茶性寒,并且富含鞣质、脾胃虚寒的

患者、秋冬寒凉季节均不宜饮用。黑茶作为一种后发酵茶,不仅含有茶多酚,并且在长时间渥堆发酵的过程中有诸多微生物参与茶叶物质的转化,同时在这个发酵过程中也产生了茶色素等不同于其他茶叶的成分。茶色素具有较好的调节血脂代谢紊乱和显著的抗脂质过氧化、清除自由基及抗凝、促纤溶作用^[10]。茯砖茶属于安化黑茶中的特色茶叶,在其发花过程所产生的优势真菌冠突散囊菌具备一定的自由基清除能力,同时其分泌的儿茶素衍生物等具备比茶多酚更强的抗氧化能力,是医学领域具有很大优势的微生物^[11-13]。有研究发现冠突散囊菌液体发酵物的结构与降脂药物洛伐他汀相似^[14]。课题组前期已有的实验证实安化黑茶中的茯砖茶对于高脂血症大鼠具有降脂、抗炎的作用,可降低大鼠主动脉肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor, TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)的表达水平^[15];抑制高脂血症大鼠主动脉核转录因子NF- κ B(nuclear factor, NF- κ B)蛋白质和基因的表达^[16]。茯砖茶中的成分具有抗炎、抗氧化、降脂和保护血管内皮细胞的作用,需要通过动物实验来进一步验证。

载脂蛋白E(APOE)参与血中总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)的转运与清除,在脂蛋白的代谢中发挥着重要的作用^[17]。载

脂蛋白 E 基因敲除(APOE^{-/-})小鼠完全缺失 APOE, 导致血浆中的低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein, LDL)、(very low density lipoprotein, VLDL)、乳糜微粒等物质清除能力受损,引起血浆中的胆固醇水平的升高^[18],为此 APOE^{-/-}小鼠是目前研究 AS 最为广泛的理想动物模型,作者采用 APOE^{-/-}小鼠复制 AS 模型,观察安化黑茶中的茯砖茶对于 AS 干预的效果,以期为深入研究安化黑茶抗 AS 的机制研究提供更多的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 8 周龄 APOE^{-/-}雄性小鼠 55 只, 体质量(25±5) g, SPF 级,购自于南京大学生物模式中心,动物许可证号为 SCXK(苏)2015-0001,品系名 APOE Cas9-KO, 品系编号 T001458, 配繁信息为-82bp/wt 配 B6J, 遗传背景 C57BL/6, 基因型:(APOE)KO/KO;8 周龄 C57BL/6J 野生型雄性小鼠 10 只,动物许可证号 SYXK(湘)2016-0002;本实验通过湖南中医药大学伦理委员会审查,动物伦理批准号为 20171001,实验单位许可证编号 SYXK(湘)2013-0005。

1.1.2 药物及试剂 天茯茶:湖南省白沙溪茶厂馈赠;阿托伐他汀(规格:10 mg,批号 110590):辉瑞制药有限公司产品。生理盐水、多聚甲醛(biosharp)、水合氯醛:天津市科密欧化学试剂有限公司产品;mouse 氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low-density lipoprotein, OX -LDL) ELISA Kit、mouse TNF- α ELISA Kit、mouse 白细胞介素-1 β (interleukin1 β , IL-1 β) ELISA Kit、mouse 高敏感性 C-反应蛋白 (high-sensitivity CRP, hs-CRP)ELISA Kit、mouse 单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) ELISA Kit 试剂盒:武汉基因美生物科技有限公司产品;苏木素染色液:北京中杉金桥生物技术有限公司产品;伊红染色液:北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

1.1.3 饲料配方 西方饮食饲料由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2014-0008,型号:H10141(脂肪 21%,0.15%胆固醇,具体配方:酪蛋白、蛋氨酸、玉米淀粉、麦芽糖糊精、纤维素、玉米油、无水奶油、矿物质混合物、碳酸钙、维生素混合物、胆固醇)。

1.1.4 主要仪器 体式显微镜、光学显微镜:日本奥林巴斯公司产品;超低温冰箱:海尔股份有限公司产品;全自动生化分析仪:贝克曼库尔特公司产品;高速冷冻离心机:德国 Hermle 公司产品;超纯水机:上海摩勒科学仪器有限公司产品;生物组织自动脱水机:亚光医用电子技术公司产品;石蜡包埋机:德国 LEICA 仪器公司产品;石蜡切片机:德国 LEICA 仪器公司产品;恒温干燥箱:福码实验设备有限公司产品;多功能酶标仪:perkinelmer 公司产品;电热蒸汽灭菌器:美国 ZEALWAY 公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 药物制备 按照黑茶推荐成人饮用量干茶 10 g/d 的剂量来换算实验动物所需剂量(以 60 kg 人的体质量和 20 g 小鼠体质量作为参考,查阅实验动物与人的体表面积比值表进行换算)。将白沙溪天茯茶用茶刀切取适量,带无菌手套将其掰成小块状称量,用无菌纱布包裹并放入烧杯中,将实验室所用 III 级水加入烧杯中浸泡 30 min,随后将烧杯放石棉网上用实验电炉进行加热,武火煮沸之后改为文火煎煮 30 min 左右,将浓缩药液倒出,黑茶残渣加水继续煎熬,将两次药液浓缩所需体积,4 000 r/min 离心 15 min 后,取上清液无菌纱布过滤后冷却放入消毒磨口瓶,4℃冰箱保存备用。为防止药液变质,每次所浓缩的药量为 1 周左右。黑茶高剂量组用药 2.16 g/kg、黑茶中剂量组用药 1.44 g/kg、黑茶低剂量组用药 0.72 g/kg。阿托伐他汀用量为 10 mg/kg,每次将 20 mg 的药片放入研钵内用研杵碾碎,加入生理盐水溶解灌胃,现配现用。

1.2.2 小鼠饲养 实验小鼠饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心独立通气笼盒(IVC)中,温度(24±0.5)℃,相对湿度(50%~70%),压差 20 Pa,昼夜光照节律。空白对照组予以普通生长饲料(湖南斯莱克景达实验动物公司提供);模型组和药物组采用西方饮食辐照饲料,饲料低温保存;为保证小鼠进食的相对一致,每天定量予以饲料供应。饮水为 III 水,垫料更换次数为一周两次,在更换垫料的同时用 84 消毒浸泡笼具,自来水冲洗晾干备用,每日补充饲料及水。

1.2.3 动物分组、造模与给药 选取 8 周龄雄性 APOE^{-/-}小鼠 55 只,持续西方饮食喂养 13 周,同时选用 8 周龄的 C57 小鼠作为空白对照予以普通饲料喂养 13 周^[19-21],13 周后随机抽取 5 只行 HE 染

色,确定造模成功后根据体质量分层,然后随机分为模型组、阿托伐他汀组和安化黑茶高、中、低剂量组。分组后的 APOE^{-/-}小鼠继续西方饮食喂养 8 周,同时每天上午 9 点左右予以相应的药物连续灌胃干预 8 周。阿托伐他汀组予以 10 mg/(kg·d) 药物灌胃给药、现配现用;黑茶高剂量组用药 2.16 g/(kg·d)、黑茶中剂量组用药 1.44 g/(kg·d)、黑茶低剂量组用药 0.72 g/(kg·d);空白组和模型组予以等剂量的生理盐水灌胃。

1.2.4 标本收集与处理 各组小鼠于灌胃第 8 周末禁食不禁水 12 h 后,依次进行以下操作:(1)将小鼠麻醉后摘眼球取血,室温静置 2 小时后将血液置于无菌 EP 管中 4 ℃ 12 000 g 离心 15 min,分离血清,-80 ℃ 分装保存用于血脂和炎症指标的检测,血清避免反复冻融。(2)脱臼处死小鼠,将小鼠胸腹腔剪开,放到冰盒或者冰块上操作,迅速摘取小鼠肝脏进行称量,生理盐水清洗后滤纸拭干,切除小鼠同一部位肝脏组织放入多聚甲醛中以备苏木精-伊红染色;摘除脾脏,清除脂肪组织后称重;迅速抽取 10 mL 冰生理盐水配 1 mL 针头心尖部进行心脏灌注,完毕后小鼠动脉组织转移到放有碎冰的培养皿中,体式显微镜工作台下操作,用眼科剪快速仔细的剔除动脉管壁上的脂肪组织,将心脏连同 0.5~1.0 cm 的主动脉弓部位眼科剪剪下后进行冲洗,转移到体积分数 4% 的多聚甲醛中,剩余动脉放入冻存管中液氮速冻,之后转移至 -80 ℃ 冻存待测,最后分离腹部脂肪组织进行称质量。固定组织后在 4 ℃ 冰箱内过夜,24 小时后常规脱水、石蜡包埋并连续切片,切片厚度 5 μm 制作石蜡切片,HE 常规染色后,于光学显微镜下观察主动脉病理形态的变化。

1.2.5 检测指标和方法

1) 血脂四项检测 将 100 μL 小鼠血清和双蒸水 1:1 稀释混匀后送到益阳医专附属医院检验科,采用贝克曼库尔特 AU680 全自动生化分析仪进行检测。

2) 血清中 OX-LDL、MCP-1、TNF-α、hs-CRP、IL-1β 水平的测定 采用酶联免疫分析法(ELISA)进行测定,测试样本前提前 30 min 打开酶标仪进行预热,用多功能酶标仪 450 nm 光波下进行检测相关 OD 值,参照说明书中标准品的浓度绘制标准曲线,将 OD 值代入曲线方程中,计算出样品的浓度,对于所得浓度运用统计学软件进行数据分析。

1.2.6 统计学处理 将实验所得数据运用 SPSS18.0 统计学软件进行分析,采用单因素方差分析的统计学方法来比较多组间均数,针对组间两两比较齐者的数据进行 LSD 检测, $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 HE 染色结果

图 1 为 HE 染色结果。空白对照组(图 A:40X;图 B:100X):小鼠动脉管壁光滑完整,瓣膜及管壁附近无斑块附着,管腔中空,内、中、外膜结构完整,层次清晰;模型组(图 C:40X;图 D:100X):小鼠动脉管壁内膜及瓣膜明显增厚,管壁附着有大量的斑块,主要成分为大量的胆固醇结晶及泡沫细胞,中膜平滑肌受压变薄,管腔明显狭窄;阿托伐他汀组(图 E:40X;图 F:100X):小鼠动脉管壁附着有斑块,主要成分为胆固醇结晶及泡沫细胞,瓣膜无明显增厚现象,斑块附近的中膜平滑肌受压变薄,管腔狭窄程度小于模型组;黑茶高剂量组(图 G:40X;图 H:100X):小鼠动脉管壁有斑块附着,呈现偏心状分布,主要成分以泡沫细胞为主,瓣膜无明显增厚,管腔面积有所狭窄;黑茶中剂量组(图 I:40X;图 J:100X):动脉管壁周围的斑块呈现偏心状分布,管

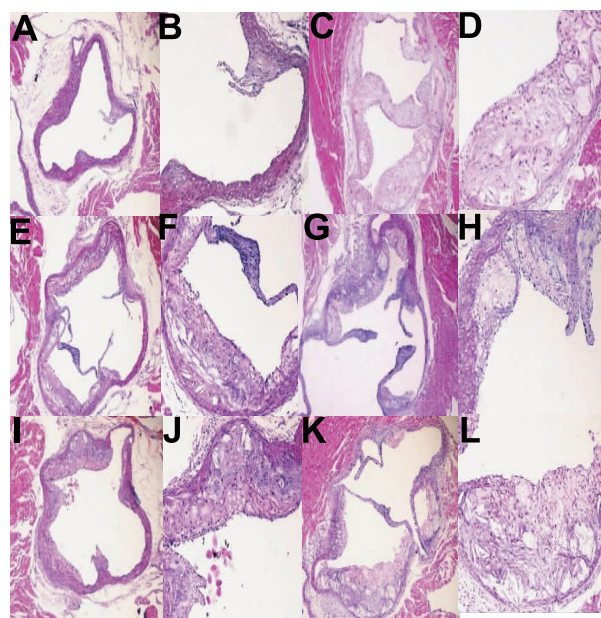


图 1 小鼠主动脉瓣膜附近苏木精-伊红染色形态学图片
Fig. 1 Morphological pictures of hematoxylin-eosin staining near mouse aortic valve

腔面积有所狭窄,斑块主要成分以泡沫细胞为主,瓣膜无明显增厚;黑茶低剂量组(图 K:40X;图 L:100X):动脉粥样斑块附着于主动脉管壁一侧,呈现偏心状分布,管腔面积减少,中膜平滑肌受压变薄,主要成分为大量的胆固醇结晶及泡沫细胞为主。

2.2 实验小鼠体质量、肝质量、腹部脂肪质量与肝指数的比较

表 1 显示:与模型组相比,空白组、黑茶高、中、低剂量组小鼠的体质量、肝质量、腹部脂肪质量、肝指数均降低($P<0.05$)。

表 1 小鼠体质量、肝质量、腹部脂肪质量、肝指数的比较($\bar{x}\pm SD, n=10$)
Table 1 The weights of body, liver, spleen, abdominal fat and the live index in mice

组别	体质量/g	肝质量/g	腹部脂肪质量/g	肝指数/%
空白组	24.1±1.08 ^{△●}	0.96±0.09 ^{△●}	0.38±0.05 ^{△●}	3.93±0.36 [△]
模型组	38.2±6.81 [*]	2.20±0.79 [●]	2.80±1.49 [*]	5.76±0.92 [●]
他汀组	38.4±5.59 [*]	1.67±0.37 [△]	3.13±1.28 [*]	4.30±0.43 [△]
高剂量	32.7±2.01 ^{△●}	1.48±0.15 [△]	1.99±0.35 ^{△●}	4.50±0.34 [△]
中剂量	30.8±2.56 ^{△●}	1.30±0.15 ^{△●}	1.38±0.41 ^{△●}	4.30±0.37 [△]
低剂量	33.7±2.42 ^{△●}	1.57±0.15 [*]	2.06±0.11 [△]	4.54±0.40 [△]

注:与空白组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组相比,[△] $P<0.05$;与阿托伐他汀相比,[●] $P<0.05$,下同

2.3 实验小鼠血脂比较

表 2 显示:与空白组相比,模型组小鼠血清中 TC、TG、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白胆固醇(high density

lipoprotein, HDL) 的浓度升高($P<0.05$);与模型组相比,黑茶不同剂量组 TG 的浓度降低($P<0.05$);与阿托伐他汀相比,黑茶高、中剂量组 TG 的浓度下降、HDL 的浓度升高($P<0.05$)。

表 2 小鼠血清中的 TC、TG、HDL、LDL 的比较($\bar{x}\pm SD, n=10$)
Table 2 The contents of TC, TG, HDL, LDL in the serum of mice

组别	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	HDL/(mmol/L)	LDL/(mmol/L)
空白组	2.73 ±0.26 ^{△●}	0.97±0.33 ^{△●}	2.27±0.23 ^{△●}	0.39±0.07 ^{△●}
模型组	50.5 ±4.75 [●]	4.49± 0.49 [*]	12.1±0.59 [●]	18.4±0.46 [●]
他汀组	35.8±5.14 [△]	4.21±0.21 [*]	10.0±1.03 [△]	16.3±1.87 [△]
高剂量	49.5±1.44 [●]	3.33±0.25 ^{△●}	12.2±1.35 [●]	18.1±0.41 [●]
中剂量	48.1±2.67 [●]	3.17±0.26 ^{△●}	12.3±1.28 [●]	17.8±0.51 [●]
低剂量	49.6± 2.31 [●]	3.95±0.27 [△]	11.3±1.37 [●]	18.1±0.28 [●]

2.4 血清中 OX-LDL、MCP-1、TNF-α、hs-CRP、IL-1β 的质量浓度

表 3-7 显示:与空白组相比,模型组小鼠血清中 OX-LDL、MCP-1、TNF-α、hs-CRP、IL-1β 质量浓

度升高($P<0.05$);与模型组相比,阿托伐他汀和黑茶不同剂量组小鼠血清中 OX-LDL、MCP-1、TNF-α、hs-CRP、IL-1β 的质量浓度下降($P<0.05$)。

表 3 小鼠血清中 OX-LDL 质量浓度的比较($\bar{x}\pm SD, n=10$)
Table 3 The content of OX-LDL in the serum of mice

组别	鼠数/只	剂量	OX-LDL 质量浓度/(pg/mL)
空白组	10	20 mL/(kg·d)	40.7±0.76 ^{△●}
模型组	10	20 mL/(kg·d)	43.3±0.51 [●]
他汀组	10	10 mg/(kg·d)	34.9±1.76 [△]
高剂量	10	2.16 g/(kg·d)	34.2±2.47 [△]
中剂量	10	1.44 g/(kg·d)	34.4±2.82 [△]
低剂量	10	0.72 g/(kg·d)	35.9±1.66 [△]

表4 小鼠血清中MCP-1质量浓度的比较($\bar{x}\pm\text{SD},n=10$)

Table 4 The content of MCP-1 in the serum of mice

组别	鼠数/只	剂量	MCP-1 质量浓度/(pg/mL)
空白组	10	20 mL/(kg·d)	84.8±1.03 ^{△●}
模型组	10	20 mL/(kg·d)	91.8±3.28 [●]
他汀组	10	10 mg/(kg·d)	63.8±3.79 [△]
高剂量	10	2.16 g/(kg·d)	79.2±4.33 ^{●△}
中剂量	10	1.44 g/(kg·d)	74.6±4.97 ^{△●}
低剂量	10	0.72 g/(kg·d)	78.4±3.26 ^{△●}

表5 小鼠血清中TNF-α质量浓度的比较($\bar{x}\pm\text{SD},n=10$)

Table 5 The content of TNF-α in the serum of mice

组别	鼠数/只	剂量	TNF-α 质量浓度/(pg/mL)
空白组	10	20 mL/(kg·d)	16±5.27 ^{△●}
模型组	10	20 mL/(kg·d)	134±6.84 [●]
他汀组	10	10 mg/(kg·d)	96.3±6.20 [△]
高剂量	10	2.16 g/(kg·d)	107±6.41 ^{△●}
中剂量	10	1.44 g/(kg·d)	105±6.42 ^{△●}
低剂量	10	0.72 g/(kg·d)	107±4.90 ^{△●}

表6 小鼠血清中hs-CRP质量浓度的比较($\bar{x}\pm\text{SD},n=10$)

Table 6 The content of hs-CRP in the serum of mice

组别	鼠数/只	剂量	hs-CRP 质量浓度/(pg/mL)
空白组	10	20 mL/(kg·d)	553±12.4 ^{△●}
模型组	10	20 mL/(kg·d)	624±28.7 [●]
他汀组	10	10 mg/(kg·d)	587±16.8 [△]
高剂量	10	2.16 g/(kg·d)	509±33.2 ^{●△}
中剂量	10	1.44 g/(kg·d)	535±25.4 ^{△●}
低剂量	10	0.72 g/(kg·d)	587±16.2 [△]

表7 小鼠血清中IL-1β质量浓度的比较($\bar{x}\pm\text{SD},n=10$)

Table 7 The content of IL-1β in the serum of mice

组别	鼠数/只	剂量	IL-1β 质量浓度/(pg/mL)
空白组	10	20 mL/(kg·d)	19.2±0.53 [△]
模型组	10	20 mL/(kg·d)	22.2±1.54 [●]
他汀组	10	10 mg/(kg·d)	18.5±0.7 [△]
高剂量组	10	2.16 g/(kg·d)	18.4±1.2 [△]
中剂量	10	1.44 g/(kg·d)	18.5±0.84 [△]
低剂量	10	0.72 g/(kg·d)	19.0±0.68 [△]

3 讨论

病理学 HE 染色结果显示,除空白组之外,其他各组均有不同程度的 AS,其中以模型组最为严重,模型组主要表现为动脉内膜及瓣膜明显增厚,斑块内胆固醇结晶丰富,血管管腔严重狭窄,提示模型制备成功。阿托伐他汀和黑茶不同剂量组小鼠动脉

斑块明显低于模型组,说明阿托伐他汀和黑茶对 AS 的发生发展均有抑制作用。从镜下观的成分来看,模型组、阿托伐他汀组、黑茶低剂量组主要成分为胆固醇结晶和泡沫细胞为主,而黑茶高、中剂量组主要成分以泡沫细胞为主。AS 按照病理学分为脂纹脂斑期(泡沫细胞为主)、纤维斑块期(纤维帽、脂类成分、泡沫细胞为主)、粥样斑块期(纤维帽、胆固醇

结晶和泡沫细胞为主)以及继发性病变。那么可见模型组、阿托伐他汀组、黑茶低剂量组已经发展为 AS 的中晚期,而黑茶高、中剂量组小鼠为 AS 的早期,由此得知安化黑茶高、中剂量用药治疗可以延缓 AS 的发生发展。

过度肥胖引起脂肪组织中的巨噬细胞比例增多,而且炎症表型发生变化,浸润性增强,巨噬细胞与脂肪组织中的脂肪细胞交互作用,加速了 AS 的发展进程^[2],为此抑制肥胖可以起到延缓 AS 发展的效果。实验结果显示安化黑茶不同剂量组小鼠肝脏重量和肝指数显著低于模型组及阿托伐他汀组,提示安化黑茶可以起到很好的抑制体质量增长和减少腹部脂肪组织合成的效果;还可以减少脂类物质在肝脏的沉积。这可能是安化黑茶延缓 AS 发展的原因之一。

高脂血症是引起 AS 发生的最主要的危险因素,从血脂四项检测结果来看,安化黑茶可以有效降低 TG 含量,但是对于 TC、LDL、HDL 方面并没有明显的改善,可见安化黑茶在降低 TG 方面有明显的优势,并且效果优于阿托伐他汀。过多的脂类物质在动脉管壁的长期沉积加速 AS 的发生发展,而黑茶不同剂量组均可以通过抑制 TG 的合成来延缓 AS 的发生发展,这可能是黑茶延缓 AS 发展的原因之一。而阿托伐他汀在降低 TG 含量上具有明显的优势。为此推荐高脂血症患者在日常生活中可以适当饮用黑茶来抑制甘油三酯的产生。而对于混合性高脂血症等症患者我们建议在服用他汀类药物降低胆固醇的同时,可以配合常规摄入黑茶的方式来降低体内的甘油三酯的含量,从而抑制脂类物质在动脉管壁的沉积来延缓 AS 的发生发展。

OX-LDL 主要是由于体内的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)生成增多并且发生氧化修饰所产生的, OX-LDL 具有细胞毒性,可以通过多种途径造成内皮细胞的损伤,并且对于血液中的单核细胞具有很强的趋化作用,从而促进泡沫细胞的形成和中膜平滑肌的迁移,是诊断 AS 的最佳指标^[23-25],故降低血液循环中的 OX-LDL 水平是预防 AS 形成的重要途径。在内皮损伤的过程中,巨噬细胞释放出 IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1 等炎症因子,炎症反应过程中促使肝细胞产生大量的 hs-CRP 急性时相反应物,为此,作者通过检测血清中 OX-LDL、IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1、hs-CRP 5 个指标来进一步探索安

化黑茶对于 AS 的干预机制。

“氧化应激学说”是比较公认的引起 AS 的学说之一,本次实验显示阿托伐他汀和黑茶不同剂量中 OX-LDL 含量明显低于模型组,说明阿托伐他汀和黑茶用药治疗均可以起到抗氧化的作用,从而减少了 LDL 的氧化修饰对于机体所造成的损伤。

AS 属于慢性炎症性疾病,炎症反应伴随着 AS 发生发展的始终,抗炎治疗被认为是治疗 AS 的有效措施。MCP-1 作为作用很强的单核细胞趋化因子,具有调节单核细胞粘附和进入动脉管壁的双重功能,其在单核细胞进入动脉内膜的过程中发挥着重要的作用,在 AS 发生的后期,对于促进斑块的不稳定性也起着重要的作用^[26]。阿托伐他汀和黑茶不同剂量组均可以有效抑制 MCP-1 的产生,从而起到了抑制泡沫细胞合成分泌的作用,延缓了 AS 的发生发展。

TNF- α 是一种具有介导免疫反应和炎症反应的重要的前炎症因子,可以刺激白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和细胞粘附分子的表达,参与炎症反应的级联过程中,从而发挥促炎作用,其容易聚集到内皮细胞处造成内皮的损伤,为 AS 的形成创造条件^[27-28]。从实验数据来看,阿托伐他汀和黑茶不同剂量组灌胃用药均可以通过抑制 TNF- α 的产生来达到抗炎的作用。

hs-CRP 作为一种重要的炎症反应标志物,其水平的变化可直接反映 AS 斑块的炎症反应程度^[29]。临床诸多实验验证 C 反应蛋白与 AS 的发生密切相关,是引发心血管疾病的独立危险因素^[30]。有研究证实 hs-CRP 可以起到调节单核细胞的作用,可激活补体和刺激组织因子的产生,从而导致血管内膜的损伤,使得脂类物质易于在血管内皮聚集,为 AS 的产生创造了条件^[31]。本实验可观察到安化黑茶高、中剂量用药可以有效地抑制 hs-CRP 的分泌,那么我们推测安化黑茶可以减少补体的产生,从而抑制炎症反应对血管内皮细胞的损害,防止脂类物质在内皮表面的附着。

IL-1 β 作为白介素中重要的基因编码,主要起着促炎作用,动物实验已经验证拮抗 IL-1 β 信号通路可以起到很好的抑制 AS 发生的作用^[32]。本实验结果显示阿托伐他汀和黑茶不同剂量组小鼠血清中 IL-1 β 的含量有所下降,那么既然 IL-1 β 作为重

要的促炎因子,它的减少便可以有效的抑制 TNF- α 、hs-CRP 等诸多因子的产生,可以说抑制 IL-1 β 的产生对于抑制整个炎症反应其中至关重要的作用。由此可见黑茶和阿托伐他汀均可以通过拮抗 IL-1 β 信号通路而起到抗炎的作用。

从以上数据分析,安化黑茶延缓 AS 的发生可能与以下因素有关:1)安化黑茶通过抑制脂类物质在肝脏和动脉管壁的沉积来延缓 AS 的发展;2)安化黑茶可以通过抑制 IL-1 β 、TNF- α 、hs-CRP 等重要的促炎因子从而达到抑制炎症反应的作用;3)安

化黑茶可以通过抑制 MCP-1 和 OX-LDL 等重要的单核细胞趋化因子来防止过多的泡沫细胞在内皮细胞表面的沉积;4.安化黑茶具有抗氧化作用,可以减少 LDL 的氧化修饰,从而有效的抑制泡沫细胞的形成和减缓内皮细胞的损伤。

但是 AS 的发病机制尚不清楚,作者只是通过其降脂、抗炎、抗氧化、保护血管内皮细胞方面来分析其抗 AS 的可能机制。在后期的实验过程中,我们会从其他方面来进一步的验证,以期全方位、多角度的进一步分析其抗 AS 发生发展的机制。

参考文献:

- [1] CHEN Weiwei,GAO Runlin,LIU Lisheng,et al. Summary of China cardiovascular disease report 2016[J]. **Chinese Circulation Journal**,2017,32(6):521-530.(in Chinese)
- [2] CONTE S M,VALE P R. Peripheral arterial disease[J]. **Heart Lung Circ**,2018,27(4):427-432.
- [3] WANG Jianqi,SHI Xubo,MA Changsheng,et al. Research progress of inflammation as a method to predict and prevent cardiovascular events[J]. **Adv Cardiovasc Dis**,2018,39(5):687-690.(in Chinese)
- [4] FUJII S. Atherosclerosis,chronic inflammation,and thrombosis:In search of the missing link in laboratory medicine [J]. **Rinsho Byori**,2015,63(5):605.
- [5] LIU Juntian. Progress in inflammatory pathogenesis of atherosclerosis [J]. **Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)**,2015,36(2):141-152.(in Chinese)
- [6] CHEN Gang,JIA Pin. Effect and mechanism of green tea polyphenols on serum level of uric acid in rats with fructose-induced hyperuricemia[J]. **Food Science**,2017,38(23):219-223.(in Chinese)
- [7] LIN Yuhua,CHEN Jinchuan,HUANG Bowei,et al. Mechanism of action of tea polyphenols in diabetes glycolipid metabolism [J]. **Fujian Journal of Traditional Chinese Medicine**,2017,48(5):37-38.(in Chinese)
- [8] TANG Xi,GOU Bo,LIU Hong,et al. Inhibitory effect of green tea polyphenols on atherosclerosis in rabbit [J]. **Journal of West China University of Medical**,2016,28(2):177-180.(in Chinese)
- [9] FENG Lingran,WANG Qiang,LUO Wei,et al. Screening and identification of strains with tea polyphenols[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(7):763.(in Chinese)
- [10] WANG L,WU J L,WU Q P,et al. A review of the lipid-lowering activity and mechanism of Fructus crataegi [J]. **Food Science**,2015,36(15):245-248.
- [11] YANG Fulin,DENG Fangming,ZHAO Lingyan,et al. Development of dominant fungi in Fuzhuan tea during the growing process[J]. **Tea Science and Technology**,2005(1):4-7.(in Chinese)
- [12] HUANG Yan,SHI Rui,SU Erzheng,et al. Progress in the research and application of the Eurotium cristatum [J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**,2017,15(1):49-56.(in Chinese)
- [13] LIU Gang,YANG Yan,HU Tingting,et al. Effect of prinsepiautilis fermented tea on hyperlipemia mice [J]. **Journal of Food Scienceand Biotechnology**,2018,37(3):324-326.(in Chinese)
- [14] LV Jiali,ZHENG Xinxin,MA Yaning. Study on lipid-lowering substances from eurotium cristatum by liquid fermentation[J]. **Journal of Shaanxi University of Science&Technology**,2014(6):115-118.(in Chinese)
- [15] TANG Yan,YI Jian,PENG Qianyan,et al. Influence of dark tea on hyperlipidemia rats blood lipid and inflammatory cytokines TNF- α ,IL-6[J]. **Journal of Liaoning University of TCM**,2016,18(9):25-28.(in Chinese)

- [16] TANG Yan, YI Jian, PENG Qianyan, et al. Influence of dark tea on aortic NF- κ B of rats with hyperlipidemia [J]. **Journal of Emergency in Traditional Chinese Medicine**, 2016, 25(3): 390-395. (in Chinese)
- [17] EICHNER J E, DUNN S T, PERVEEN G, et al. Apolipoprotein polymorphism and cardiovascular disease: A huge review [J]. **American Journal of Epidemiology**, 2002, 155(6): 487.
- [18] TANI M, MATERA R, HORVATH K V, et al. The influence of apoe-deficiency and LDL-receptor-deficiency on the HDL subpopulation profile in mice and in humans [J]. **Atherosclerosis**, 2014, 233(1): 39-44.
- [19] MOORE K J, SHEDDEN F J, FISHER E A. Macrophages in atherosclerosis: A dynamic balance [J]. **Nat Rev Immunol**, 2013, 13(10): 709-721.
- [20] LIU Yuhui, HOU Beibei, YOU Yu, et al. Effect of buyang Huanwu Tang in stabilizing vulnerable plaques of Apoe^{-/-} mice atherosclerosis [J]. **Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae**, 2018, 24(15): 112-114. (in Chinese)
- [21] HUANG Y, MAHLEY R W. Apolipoprotein E: Structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases [J]. **Neurobiology of Disease**, 2014, 72 Pt A: 3-12.
- [22] WANG Mingxia, JIA Lihong, ZHAI Lingling, et al. Research progress on atherosclerosis promoted by endoplasmic reticulum stress of adipose tissue in children with obesity [J]. **China Medical Herald**, 2018, 15(32): 24-25. (in Chinese)
- [23] WANG Chunyang, LIU Jin, YANG Bin, et al. Oxidized low density lipoprotein as a biomarker for cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. **Cardiovascular Disease Journal of integrated traditional Chinese and Western Medicine**, 2018, 6(11): 177. (in Chinese)
- [24] DIPIETRO N, FORMOSO G, PANDOLFI A. Physiology and pathophysiology of ox LDL uptake by vascular wall cells in atherosclerosis [J]. **Vascul Pharmacol**, 2016, 84: 1-7.
- [25] CHISTIakov D A, BOBRYshev Y V, OREKHOV A N. Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis [J]. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 2016, 20(1): 17-28.
- [26] JIANG Yina, CHEN Nahong. Mechanism of CCL2/MCP in its related diseases [J]. **Chinese Pharmacological Bulletin**, 2016, 32(12): 1234-1236. (in Chinese)
- [27] EDSFELDTA, GRUFMAN H, ASCIUTTO G, et al. Circulating cytokines reflect the expression of pro-inflammatory cytokines in atherosclerotic plaques [J]. **Atherosclerosis**, 2015, 241(2): 443-449.
- [28] HELD C, WHITE H D, STEWART R A H, et al. Inflammatory biomarkers interleukin-6 and C-reactive protein and outcomes in stable coronary heart disease: experiences from the stability trial [J]. **Journal of the American Heart Association**, 2017; 6(10): 1-14.
- [29] HARTMAN J, FRISHMAN W H. Inflammation and atherosclerosis: A review of the role of interleukin-6 in the development of atherosclerosis and the potential for targeted drug therapy [J]. **Cardiology in Review**, 2014, 22(3): 147-151.
- [30] WANG Jianqi, SHI Xubo. Research progress of inflammation as a method to predict and prevent cardiovascular events [J]. **Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease**, 2018, 39(5): 688-699. (in Chinese)
- [31] DE FERRANTI S D, RIFAI N. C-reactive protein and cardiovascular disease: A review of risk prediction and interventions [J]. **Clinica Chimica Acta**, 2002, 317: 1-15.
- [32] LU Hao, LI Menghao, XI Dan, et al. Research progress of treatment of atherosclerosis by targeting interleukin-1 β [J]. **Chinese Journal of Arteriosclerosis**, 2015, 23(4): 411-416. (in Chinese)