

# 血脂康对动脉粥样硬化的预防作用

胡杨兮 赵仙先 荆清

**【摘要】** 目的:探讨血脂康对斑马鱼动脉粥样硬化的预防作用。 方法:以二甲基亚砷为阴性对照,辛伐他汀为阳性对照,对斑马鱼脂代谢紊乱模型进行不同浓度的血脂康处理,通过油红 O 染色、直接测量血脂、荧光显微镜拍照等方法评估血脂康对动脉粥样硬化的预防作用。 结果:油红 O 染色显示血脂康 10  $\mu\text{g/mL}$  及以上浓度处理组中幼鱼血管内脂质沉积显著减轻;脂质含量测定显示血脂康 5  $\mu\text{g/mL}$  处理组幼鱼组织匀浆中各类脂质成分明显降低;荧光显微镜活体观察发现血脂康 2  $\mu\text{g/mL}$  及以上浓度处理组幼鱼的中性粒细胞在血管内的募集受到显著抑制。 结论:血脂康通过降低血脂和抑制中性粒细胞在血管内的募集,预防动脉粥样硬化。

**【关键词】** 斑马鱼;高脂血症;血脂康;动脉粥样硬化

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2020.02.008

**Preventive effects of Xuezhikang on atherosclerosis** HU Yangxi, ZHAO Xianxian, JING Qing  
Department of Cardiology, Changhai Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200433, China

**【Abstract】** **Objective:** To explore the preventive effects of Xuezhikang on atherosclerosis in zebrafish. **Methods:** Using dimethyl sulfoxide as the negative control and simvastatin as the positive control, the zebrafish models of lipid metabolism disorder were exposed in different concentrations of Xuezhikang. Oil red O staining, direct measurement of lipid content and fluorescence microscopy were used to evaluate the preventive effects of Xuezhikang on atherosclerosis. **Results:** Oil Red O staining showed significant reduction in intravascular lipid deposition in zebrafish of Xuezhikang groups, which were exposed in 10  $\mu\text{g/mL}$  and above Xuezhikang. Lipid measurements revealed that various types of lipids in whole tissue homogenate of zebrafish in 5  $\mu\text{g/mL}$  Xuezhikang treatment group were significantly decreased. In vivo observation with the fluorescent microscope displayed that neutrophil recruitment in zebrafish of the 2  $\mu\text{g/mL}$  and above Xuezhikang treatment groups was significantly inhibited. **Conclusions:** The prevention of atherosclerosis by Xuezhikang may be caused by lowering blood lipids and inhibiting the recruitment of neutrophils in blood vessels.

**【Key words】** Zebrafish; Hyperlipidemia; Xuezhikang; Atherosclerosis

斑马鱼又名蓝条鱼、花条鱼、印度鱼,多生活于中亚和南亚的热带地区。1984 年美国科学家率先对斑马鱼的发育和遗传进行研究。由于斑马鱼性成熟周期短、产卵量大,十分适用于高通量在体筛选研究,如用于新药开发、药理及毒理研究和病理生理学研究。斑马鱼基因组已经测序完毕,其与人

类基因组高度同源。斑马鱼胚胎透明,可在显微镜下直视观察,广泛用于组织发育、心血管和神经系统疾病、肿瘤发生和转移、代谢病、炎症等研究领域。

血脂康是一种由红曲精制而成的中成药,含有多他汀类药物成分,被称为“天然他汀”,主要成分是洛伐他汀及其同系物。他汀类药物的结构与三羟三甲基戊二酸单酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶相似,与其存在竞争性抑制作用,可以减少胆固醇的合成,降低总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平。有报道称,血脂康还具有降压、稳定粥样斑块、改善内皮细胞功能的作用<sup>[1]</sup>。由于血

基金项目:长海医院青年启动基金(CH201805)

作者单位:200433 上海,海军军医大学附属长海医院心血管内科

通信作者:荆清, E-mail: jingqingsmmu@sina.com

脂康成分复杂,在体代谢转化则更为复杂,其预防动脉粥样硬化的作用尚不完全清楚。本研究通过观察血脂康对斑马鱼模型脂代谢、血管脂质沉积及中性粒细胞募集的影响,探讨其对动脉粥样硬化的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 模型构建

1.1.1 实验动物 本研究使用的血管内皮细胞及中性粒细胞双荧光(Tg)品系斑马鱼,均由海军军医大学附属长海医院提供。斑马鱼养殖设备和饲养方法及相关实验操作均符合医院实验动物伦理委员会规定。斑马鱼饲养于 28.5℃、pH=7.0 的循环水系统(北京爱生科技发展有限公司)中,以昼 14 h 夜 10 h 光照循环。胚胎发育过程中为阻止色素形成,在培养水中加入 0.003% 2-苯硫脲(德国 Sigma 公司)。胚胎发育时相的判断依据见文献[2]。

1.1.2 饲料及喂食 根据实验需要从受精后 4 d 开始对幼鱼喂食不同饲料。普通饲料:常规饲料草履虫<sup>[3]</sup>;高脂饲料:将蛋黄粉(北京索莱宝科技有限公司)加入普通饲料中充分混匀后制成 0.1% 蛋黄液。饲料共喂食 2 d,每日 3 次,每 4 h 更换新配制的培养水和饲料。在后续实验步骤中,以喂食高脂饲料的幼鱼作为血管内脂代谢紊乱模型,并按照既往报道的方法进行相应药物处理<sup>[4]</sup>。

### 1.2 实验动物分组及处理

1.2.1 药物及使用方法 辛伐他汀片购自杭州默沙东制药有限公司,使用时研磨成粉末后溶解于二甲基亚砜(DMSO,德国 Sigma 公司)中,形成 0.5 mg/mL 储液。去除血脂康(北京北大维信生物科技有限公司)胶囊外壳,将内容粉末溶解于 DMSO 中,用漩涡振荡器充分振荡混合后形成 15 g/L 储液,−20℃ 分装保存。以上储液中 DMSO 浓度≤0.5% (W/V)。使用时根据实验需要将储液加入培养水中形成不同浓度,对斑马鱼进行 24 h 药浴。

1.2.1 实验动物分组 取洁净的 12 孔板,将所构建的动物模型随机平均分为 12 组,逐孔移入 12 孔板中,每孔补充培养水至 2 mL。对照组:将作为阴性对照的 DMSO 储液加入培养水中,终浓度为 0.5% (W/V)。辛伐他汀(处理)组:即阳性对照组,将辛伐他汀储液加入培养水中,终浓度为 0.4 mg/L。血脂康(处理)组:取不同体积的血脂康储液分别加入相应处理组培养水中形成 1、2、5、10、20、40、75、150、300、500 μg/mL 浓度梯度。

### 1.3 油红 O 染色

斑马鱼体内脂肪用油红 O 染料(德国 Sigma 公司)染色。将幼鱼用高浓度三卡因(tricaine)安乐死后,在 4% 多聚甲醛中固定 24 h,磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗 2 次后用 60% 异丙醇浸泡 30 min,0.3% 油红 O 工作液染色 3 h,最后再用 PBS 漂洗 1 次。

### 1.4 显微镜拍照

使用体式显微镜对油红 O 染色拍照。将斑马鱼在甲基纤维素中固定,拍照时头部统一位于视野左方,腹部位于视野下方。相同放大倍数的图片使用相同的曝光时间、光圈等拍摄参数。

使用荧光体式显微镜对活体幼鱼进行拍照。在 Tg 转基因鱼系中,红色荧光蛋白标记血管内皮细胞,绿色荧光蛋白标记中性粒细胞。先将斑马鱼用三卡因麻醉,在甲基纤维素中侧卧、固定,切换红、绿滤光片并分别拍照。

### 1.5 血脂相对定量及中性粒细胞计数

油红 O 染色照片使用 Image-Pro Plus 6.0 软件(美国 Media Cybernetics 公司)分析,测量躯干部 5 个连续节段血管内累计光密度(IOD),并以此作为血管内脂质的相对定量参数。使用相同软件对活体幼鱼照片中绿色荧光标记的中性粒细胞进行计数。

### 1.6 脂质水平检测

根据实验需要,将特定实验分组的 30 条幼鱼用高浓度三卡因安乐死后收集于 1.5 mL 离心管,加入 1 mL PBS 在冰上用超声匀浆器反复敲打,然后迅速用 4℃ 离心机 6 000×g 离心 15 s,用 0.45 μm 孔径过滤膜将组织匀浆液过滤,使用血浆 TC、三酰甘油(TG)、LDL-C 和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),按照说明书检测脂质水平。

### 1.7 统计学分析

连续计量资料以均数±标准差表示。两组计量资料经正态性检验后采用 Student's *t* 检验进行比较;经方差齐性检验后多组计量资料之间的比较采用 ANOVA 分析。以  $P<0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 血脂康减轻斑马鱼血管内脂质沉积

油红 O 染色显示在脂代谢紊乱斑马鱼模型中,腹部主动脉及节间血管内有大量红染的脂质沉积;辛伐他汀组血管内脂质沉积明显减少;在不同浓度血脂康处理组中,血脂康≥10 μg/mL 时也存在明显的降脂效果,而血脂康≤5 μg/mL 时则不明显(见图 1、表 1)。

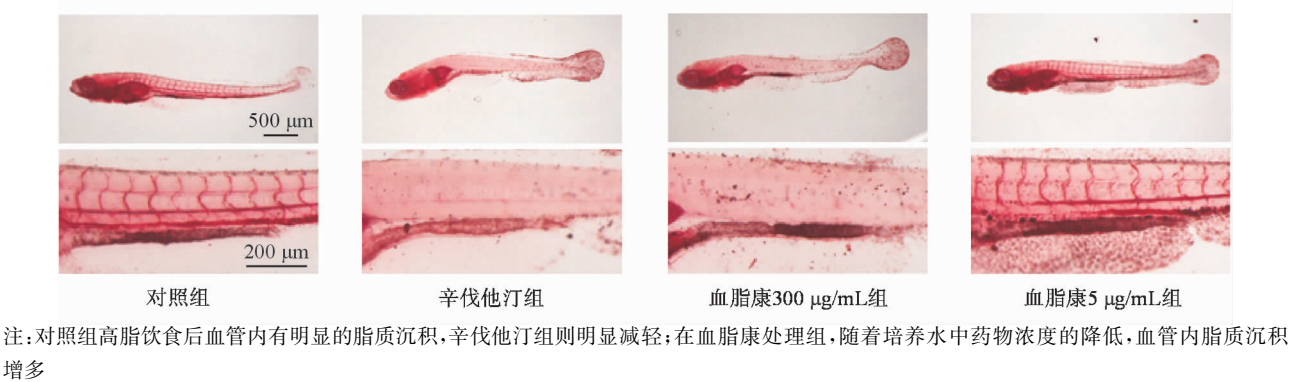


图 1 各组斑马鱼血管内脂质沉积情况

表 1 各组血管内累计光密度比较( <i>n</i> 均=6)	
分组	累计光密度( $\times 10^5$ )
对照组	55.78 $\pm$ 12.72
辛伐他汀组	8.80 $\pm$ 3.11 <sup>(1)</sup>
血脂康 500 $\mu$ g/mL 组	6.35 $\pm$ 6.75 <sup>(1)</sup>
血脂康 300 $\mu$ g/mL 组	5.04 $\pm$ 3.45 <sup>(1)</sup>
血脂康 150 $\mu$ g/mL 组	10.58 $\pm$ 11.06 <sup>(1)</sup>
血脂康 75 $\mu$ g/mL 组	30.83 $\pm$ 9.84 <sup>(1)(2)</sup>
血脂康 40 $\mu$ g/mL 组	44.65 $\pm$ 15.98 <sup>(1)(2)</sup>
血脂康 20 $\mu$ g/mL 组	28.83 $\pm$ 10.97 <sup>(1)(2)</sup>
血脂康 10 $\mu$ g/mL 组	36.37 $\pm$ 18.38 <sup>(1)(2)</sup>
血脂康 5 $\mu$ g/mL 组	38.02 $\pm$ 15.68 <sup>(2)</sup>
血脂康 2 $\mu$ g/mL 组	49.55 $\pm$ 29.08 <sup>(2)</sup>
血脂康 1 $\mu$ g/mL 组	50.05 $\pm$ 18.19 <sup>(2)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup> *P* < 0.05;与辛伐他汀组比较,<sup>(2)</sup> *P* < 0.05

2.2 血脂康降低斑马鱼组织脂质水平

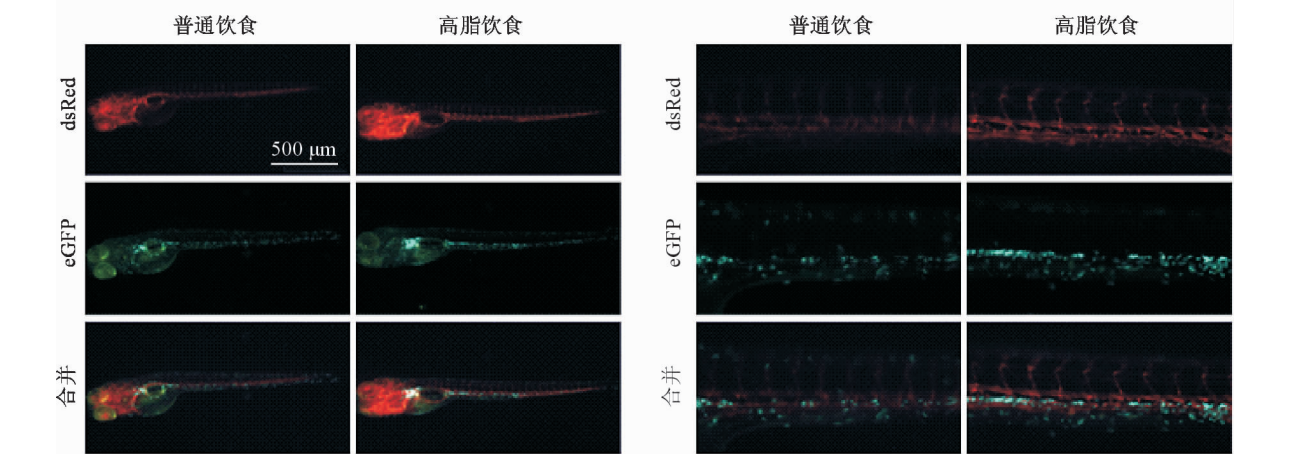
为了解血脂康对幼鱼体内各脂质成分的具体影响,我们针对血脂康 5  $\mu$ g/mL 组斑马鱼全组织匀浆液中脂质成分进行检测(见表 2)。与对照组相比,血脂康 5  $\mu$ g/mL 组 TC、TG、LDL-C 水平均明显降低,而 HDL-C 水平明显升高。

2.3 血脂康抑制血管内中性粒细胞募集

相比普通饮食组,高脂饮食组斑马鱼中性粒细胞在腹部血管募集更为显著(见图 2)。在对照组中,中性粒细胞散在分布于腹主动脉;在药物处理组中,血管内中性粒细胞明显减少(见图 3),随着血脂康水平下降,血管内中性粒细胞数量增多。当血脂康  $\leq 2$   $\mu$ g/mL 时,血管内中性粒细胞的募集与对照组差异无统计学意义(见表 3)。

表 2 两组幼鱼组织匀浆脂质成分的比较( <i>n</i> 均=6)/ mmol · L <sup>-1</sup>				
分组	TC	TG	LDL-C	HDL-C
对照组	53.39 $\pm$ 7.53	4.34 $\pm$ 0.45	22.94 $\pm$ 0.65	1.63 $\pm$ 0.42
血脂康 5 $\mu$ g/mL 组	19.80 $\pm$ 4.69 <sup>(1)</sup>	1.32 $\pm$ 0.24 <sup>(2)</sup>	15.31 $\pm$ 1.24 <sup>(2)</sup>	4.24 $\pm$ 0.63 <sup>(1)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup> *P* < 0.01, <sup>(2)</sup> *P* < 0.001



注:eGFP 为中性粒细胞;dsRed 为血管内皮细胞

图 2 高脂饮食诱导斑马鱼的中性粒细胞在血管聚集

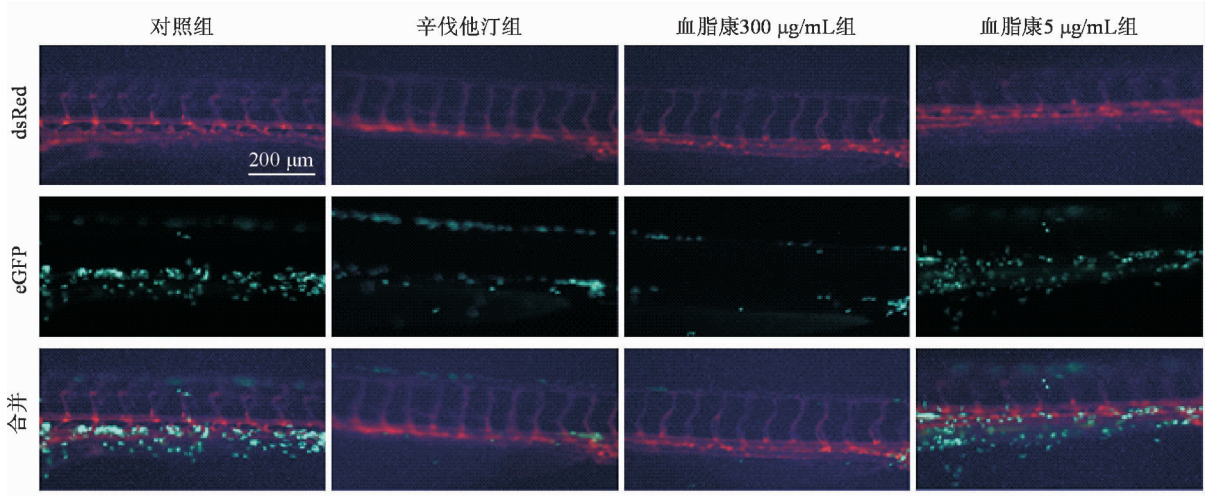


图 3 血脂康抑制中性粒细胞在血管的聚集

表 3 各组血管内中性粒细胞计数比较(*n* 均=6)

分组	中性粒细胞/个
对照组	133.33 ± 43.2
辛伐他汀组	21.17 ± 26.86 <sup>(1)</sup>
血脂康 500 μg/mL 组	9.67 ± 10.70 <sup>(1)</sup>
血脂康 300 μg/mL 组	13.50 ± 5.99 <sup>(1)</sup>
血脂康 150 μg/mL 组	10.67 ± 6.44 <sup>(1)</sup>
血脂康 75 μg/mL 组	22.00 ± 18.49 <sup>(1)</sup>
血脂康 40 μg/mL 组	36.83 ± 25.31 <sup>(1)</sup>
血脂康 20 μg/mL 组	70.83 ± 40.13 <sup>(1)(2)</sup>
血脂康 10 μg/mL 组	114.00 ± 56.24 <sup>(2)</sup>
血脂康 5 μg/mL 组	80.67 ± 49.00 <sup>(1)(2)</sup>
血脂康 2 μg/mL 组	88.00 ± 51.51 <sup>(2)</sup>
血脂康 1 μg/mL 组	98.67 ± 45.89 <sup>(2)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup> *P* 均<0.05;与辛伐他汀组比较,<sup>(2)</sup> *P* 均<0.05

3 讨论

血脂康除活血、化淤、降脂外,还有化浊、健脾、消食等功效,因其疗效确切,不良反应少,广泛用于高脂血症、动脉粥样硬化、高血压、冠状动脉粥样硬化性心脏病、肾病综合征的预防和治疗<sup>[5]</sup>。血脂康成分复杂,除含有他汀类药物的降脂成分外,还有多元不饱和脂肪酸如棕榈酸、亚油酸、油酸和硬脂酸等<sup>[6]</sup>。这些多元不饱和脂肪酸被机体吸收后,TC、TG、LDL-C 和极低密度脂蛋白胆固醇水平均可降低,而 HDL-C 升高,具有良好的血脂清除作用<sup>[7]</sup>。本研究结果与上述研究一致,显示血脂康对斑马鱼模型也存在强力的降脂作用,其作用可能是一方面减少脂质的内源性运输,一方面增加脂质由外周组织向肝脏的转运,进而促进其分解代谢。此外,血脂康所含的植物甾醇能减少肠道对胆固醇的吸收,异黄酮能增加胆固醇 7α-羟化酶的合成以促

进胆固醇代谢<sup>[8]</sup>。

在动脉粥样硬化早期病变中,血管内中性粒细胞在内皮下大量募集,释放多种细胞因子、炎性介质,引起局部炎症反应;进而诱导单核-巨噬细胞进入,吞噬氧化型低密度脂蛋白形成泡沫细胞,促进脂质条纹生成,并且能进一步激活巨噬细胞,加重动脉病变。多项临床研究发现,在晚期动脉粥样硬化斑块中,中性粒细胞的数量、活性与急性冠脉综合征、不稳定斑块破裂、血栓形成等心血管事件的发生率呈正相关<sup>[9-10]</sup>。血脂康通过抑制中性粒细胞募集或阻碍其中间过程,对这些疾病发挥一定治疗作用<sup>[11]</sup>。在斑马鱼早期的动脉粥样硬化模型中,芥菜籽<sup>[12]</sup>、大黄酚<sup>[4]</sup>等中药及其提取物可抗中性粒细胞募集,发挥抗动脉粥样硬化的作用。血脂康可能也对中性粒细胞募集有抑制作用,本研究在斑马鱼高脂模型上证实了这一假设。

本研究还存在一些不足。首先,成鱼实验周期长,不适用于大规模、高通量实验;幼鱼周期短、成本低,但体量微小且各器官发育尚在早期阶段,难以进行血检验、切片等实验。因此,本研究仅测量幼鱼整体组织匀浆脂质水平,未进一步确认早期动脉粥样斑块的形成。其次,无法精确定量每一条幼鱼的进食、消耗和排泄。在实验中我们定时在显微镜下观察幼鱼发育和进食的情况,及时舍弃不健康或不进食的幼鱼,但仍无法完全消除个体差异对实验结果的影响。

参 考 文 献

[1] Gaist D, Goldstein LB, Soriano LC, et al. Statins and the risk of intracerebral hemorrhage in patients with previous ischemic stroke or transient ischemic attack [J]. Stroke, 2017, 48(12):3245-3251.



- [2] Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Dev Dyn, 1995, 203(3):253-310.
- [3] Hensley MR, Leung YF. A convenient dry feed for raising zebrafish larvae[J]. Zebrafish, 2010, 7(2):219-231.
- [4] Chen K, Wang C Q, Fan Y Q, et al. Optimizing methods for the study of intravascular lipid metabolism in zebrafish[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(3):1871-1876.
- [5] 夏玲红, 孙黎, 王玉洪, 等. 血脂康临床应用研究进展[J]. 医药导报, 2018, 37(S1):56-58.
- [6] 中国老年学和老年医学学会心脑血管病专业委员会. 血脂康(胶囊)临床应用中国专家共识组. 血脂康(胶囊)临床应用中国专家共识(2017 修订版)[J]. 中华内科杂志, 2018, 57(2):97-100.
- [7] 李霞, 袁凤来, 袁丽萍, 等. 多不饱和脂肪酸调血脂作用研究进展[J]. 安徽医药, 2007, 11(10):867-869.
- [8] Feng D, Sun JG, Sun RB, et al. Isoflavones and phytosterols contained in Xuezhikang capsules modulate cholesterol homeostasis in high-fat diet mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36(12):1462-1472.
- [9] Verdoia M, Barbieri L, Di Giovine G, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio and the extent of coronary artery disease: results from a large cohort study[J]. Angiology, 2016, 67(1):75-82.
- [10] Carlucci PM, Purmalek MM, Dey AK, et al. Neutrophil subsets and their gene signature associate with vascular inflammation and coronary atherosclerosis in lupus[J]. JCI Insight, 2018, 3(8):1-15.
- [11] Knight JS, Subramanian V, O'dell AA, et al. Peptidylarginine deiminase inhibition disrupts NET formation and protects against kidney, skin and vascular disease in lupus-prone MRL/LPR mice[J]. Ann Rheum Dis, 2015, 74(12):2199-2206.
- [12] 何菲. 芥菜籽对斑马鱼动脉粥样硬化的预防作用[D]. 广州: 南方医科大学, 2012.

(收稿:2019-09-30 修回:2019-12-26)

(本文编辑:丁媛媛)

**To cure sometimes,  
to relieve often,  
to comfort always.**

—Edward Livingston Trudeau

有时，去治愈，  
常常，去帮助，  
总是，去安慰。

—爱德华·利文斯顿·特鲁多

