

· 论著 ·

贻贝多糖 MA 对实验性动脉粥样硬化兔的作用

毛峻琴¹, 侯中海², 陈大贵², 张文² (1. 解放军 85 医院, 上海 200052; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 目的 探讨贻贝多糖 MA 对实验性动脉粥样硬化兔的降血脂作用及其机制, 并观察其对肝脏和主动脉的影响。方法 采用喂养高脂饲料的方法建立实验性动脉粥样硬化兔模型, 连续给予 MA 4 周后, 测定兔血脂水平, 如血清三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL) 水平, 以及与血脂代谢相关酶如脂蛋白酯酶 (LPL)、肝酯酶 (HL)、羟甲基戊二酸单酰辅酶-A 还原酶 (HMG-CoAR) 活性; 并进行肝脏的病理组织学和超微结构检查; 油红染色观察兔主动脉粥样硬化斑块的脂质沉积情况。结果 贻贝多糖 MA 能显著降低实验性动脉粥样硬化兔血清 TG、TC、LDL 水平, 并显著增加 HL 和 LPL 的活性 ($P < 0.05$)。MA 能减轻肝脏脂质沉积, 减少主动脉粥样硬化斑块的脂质沉积和斑块形成。结论 贻贝多糖 MA 通过增加 HL 和 LPL 活性发挥调血脂功能, 可用于防治家兔动脉粥样硬化和脂肪肝。

[关键词] 动脉粥样硬化; 贻贝; 多糖; 血脂

R[中图分类号] R931.77, R965 [文献标志码] A [文章编号] 1006-0111(2014)01-0027-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.01.007

Anti-hyperlipidemic effects of polysaccharide MA from *Mytilus coruscus* on experimental atherosclerosis in rabbits

MAO Junqin¹, HOU Zhonghai², CHEN Dagui², ZHANG Wen² (1. No. 85th Hospital of PLA, Shanghai 200052, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To explore the anti-hyperlipidemic effects and mechanism of polysaccharide MA from *Mytilus coruscus* in the experimental atherosclerosis rabbits and to observe the effects of MA on liver and aorta. **Methods** The atherosclerosis rabbit model was established by high-fat diet. The blood lipid such as triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL) in serum and enzymes metabolizing blood lipid such as lipoprotein lipase (LPL), hepatic lipase (HL) and hydroxymethylglutaryl CoA reductase (HMG-CoAR) were measured after atherosclerosis rabbits fed MA for 4 weeks. Histopathology and ultramicroscopic structure of hepatic tissue was observed. Lipid storage in aortic atherosclerotic plaque was observed by the oil red staining method. **Results** MA significantly reduced the level of TG, TC, LDL in serum and increased HL, LPL ($P < 0.05$). MA reduced lipid storage in liver and aortic atherosclerotic plaque. **Conclusion** MA might play regulating effects in serum lipid by enhancing the activities of LPL and HL, and inhibit formation of atherosclerosis and fatty liver.

[Key words] atherosclerosis; *Mytilus coruscus*; polysaccharide; blood lipid

海洋软体动物贻贝 (*Mytilus sp.*) 广泛分布于我国辽宁、山东、浙江等省沿海地区, 养殖范围广, 生产数量大, 经济价值高, 也有一定的药食价值, 在《本草纲目》、《本草拾遗》及《日华子本草》中均有记载。现代药理学研究表明, 贻贝具有促进免疫^[1]、抗肿瘤^[2]、清除氧自由基^[3]、调节血脂^[4]、抗动脉粥样硬化^[5]等药理作用。贻贝的清除氧自由基作用源于贻贝多肽^[3], 调血脂活性则基于其多糖成分^[6], 贻贝总多糖的主体成分是贻贝多糖 MA^[7]。笔者对贻贝多糖 MA 抗高血脂作用及其机制进行了试验, 同

时观察了 MA 的抗动脉粥样硬化作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 新西兰兔, 雄性, 体重 2~2.3 kg, (上海甲干生物科技有限公司, 实验动物许可证号: SCXK(沪)2010-0028)。

1.2 高脂饲料 基础饲料粉 79.5%、蛋黄粉 15%、猪油 5%、胆固醇 0.5% (上海斯莱康实验动物有限公司)。

1.3 实验药品与试剂 贻贝多糖 MA (第二军医大学药学院海洋药物教研室制备, 批号: 20110810-1); 血脂康 (北京北大维信生物科技有限公司, 批号: 20110410); 普伐他汀片 (中美上海施贵宝制药有限公司, 批号: 1103042)。三酰甘油 (TG) 测试盒 (批

[基金项目] 上海市科委生物医药重点项目 (10431902400)。

[作者简介] 毛峻琴, 女, 副主任药师。Tel: (021) 58172412, E-mail: maojq204@163.com。

[通讯作者] 张文。Tel: (021) 81871257, E-mail: wenzhang1968@163.com。

号:20100413),总胆固醇(TC)测试盒(批号:20100907),低密度脂蛋白胆固醇(LDL)测试盒(批号:20100702),高密度脂蛋白胆固醇(HDL)测试盒(批号:20100702),均为北京北化康泰临床试剂有限公司产品。总酯酶[脂蛋白酯酶(LPL)/肝脂酶(HL)]测试盒为南京建成生物工程研究所产品(批号:20111123)。兔羟甲基戊二酸单酰辅酶-A还原酶(HMG-CoAR)测试盒为上海裕平生物科技有限公司产品(批号:201111)。

1.4 实验仪器 透射电子显微镜(日立 H-600型);Anke TDL-5 离心机(上海安亭科学仪器厂);SCREEN MASTER 3000 半自动化分析仪(北京富利泰医学科技有限公司);CP225D 型电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

1.5 实验方法

1.5.1 实验步骤 在适应性喂养7 d后,于兔耳缘静脉取血,根据血脂水平将兔随机分为7组,即空白对照组,模型组,阳性对照血脂康组(0.12 g/kg)和普伐他汀组(4 mg/kg),MA低、中、高剂量组(15、30、60 mg/kg)每组6只兔。空白对照组兔喂普通颗粒饲料外,其余各组兔喂高脂饲料4周后,除空白对照组外,其他各组继续喂上述高脂饲料并开始给药。空白对照组及模型组均灌胃给予等量的0.5% CMC-Na 溶

液,其余各组给予药物,1次/d,连续给药4周。每周称重1次,根据体重调整给药剂量。

1.5.2 指标检测 在连续给药4周后,所有实验兔均禁食、自由饮水12 h,并于末次给药1 h后予3%戊巴比妥钠(1 ml/kg)麻醉。从腹主动脉取血液5 ml用于测定血脂,以3 000 r/min离心10 min,分离血清,按试剂盒说明测定TG、TCH、LDL和HDL。取小块肝脏分别行病理检查和透射电子显微镜观察超微结构。取其余肝脏,冷冻后,制备10%肝组织匀浆,待测LPL、HL和HMG-CoAR。取主动脉,将动脉血管剖开后,直接进行油红染色观察。

1.5.3 统计学处理 实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS13.0软件做方差分析和显著性检验;显著性水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 MA对实验性动脉粥样硬化兔血脂水平的影响 与空白对照组比较,模型组兔的血清TG、TC、LDL水平显著升高($P < 0.01$),HDL也有所升高。与模型组相比,MA组兔血清TG、TC、LDL明显降低($P < 0.05$),其降低程度与剂量呈一定依赖关系。阳性对照血脂康和普伐他汀组均显著降低血清TG、TC和LDL水平,HDL升高($P < 0.05$)。结果见表1。

表1 MA对高脂血症家兔血脂水平的影响($n = 6, \bar{x} \pm s, \text{mmol/L}$)

组别	TG	TC	LDL	HDL
空白对照组	0.49 ± 0.12	2.77 ± 0.60	1.46 ± 0.51	0.36 ± 0.04
模型组	3.08 ± 0.96 ⁴⁾	17.20 ± 3.76 ⁴⁾	11.84 ± 3.26 ⁴⁾	0.55 ± 0.11
血脂康组	1.61 ± 0.50 ²⁾³⁾	10.39 ± 1.69 ²⁾⁴⁾	6.99 ± 1.73 ²⁾⁴⁾	0.76 ± 0.14 ¹⁾⁴⁾
普伐他汀组	1.58 ± 0.45 ²⁾³⁾	10.49 ± 2.20 ²⁾⁴⁾	7.07 ± 2.23 ²⁾⁴⁾	0.76 ± 0.13 ¹⁾⁴⁾
低剂量组	1.34 ± 0.32 ²⁾	12.75 ± 1.67 ¹⁾⁴⁾	8.33 ± 1.67 ¹⁾⁴⁾	0.68 ± 0.09 ⁴⁾
中剂量组	1.16 ± 0.39 ²⁾	10.74 ± 1.80 ²⁾⁴⁾	7.83 ± 1.41 ¹⁾⁴⁾	0.71 ± 0.11 ⁴⁾
高剂量组	1.07 ± 0.53 ²⁾	10.66 ± 1.62 ²⁾⁴⁾	6.74 ± 1.60 ²⁾⁴⁾	0.72 ± 0.14 ⁴⁾

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

2.2 MA对实验性动脉粥样硬化兔LPL、HL和HMG-CoAR活性的影响 与空白对照组比较,模型组兔LPL、HL和HMG-CoAR活性水平明显降低($P < 0.01$)。与模型组比较,MA中、高剂量组明显增加LPL活性($P < 0.05, P < 0.01$);MA低、中、高剂量组明显增加HL活性($P < 0.05, P < 0.01$);MA对HMG-CoAR水平无显著影响。血脂康和普伐他汀可明显增加LPL和HL活性,降低HMG-CoAR活性。结果详见表2。

2.3 MA对实验性动脉粥样硬化兔肝脏的影响(图1)

2.3.1 肉眼观察 空白对照组肝脏颜色红润,质软,无异常变化;模型组肝脏体积增大,呈红黄色,包膜紧张、边缘圆钝、切面油腻,属典型肝细胞脂肪变

性;MA组和阳性药物组(并称给药组)呈轻微红黄色,质地、体积均有明显改善。

表2 MA对实验性动脉粥样硬化兔LPL、HL和HMG-CoAR活性的影响($n = 6, \bar{x} \pm s, \text{U/mg pro}$)

组别	LPL	HL	HMG-CoAR
空白对照组	10.20 ± 2.71	9.52 ± 1.77	253.61 ± 47.81
模型组	2.45 ± 0.98 ⁴⁾	1.01 ± 0.30 ⁴⁾	459.68 ± 29.78 ⁴⁾
血脂康组	7.60 ± 2.26 ¹⁾	4.14 ± 2.27 ¹⁾⁴⁾	391.22 ± 31.46 ¹⁾⁴⁾
普伐他汀组	7.42 ± 2.04 ¹⁾	3.95 ± 1.96 ¹⁾⁴⁾	383.85 ± 19.37 ²⁾⁴⁾
低剂量组	5.56 ± 2.23 ⁴⁾	3.61 ± 0.19 ¹⁾⁴⁾	435.46 ± 32.13 ⁴⁾
中剂量组	7.19 ± 1.95 ¹⁾³⁾	4.36 ± 0.59 ¹⁾⁴⁾	433.70 ± 21.53 ⁴⁾
高剂量组	8.26 ± 2.12 ²⁾	5.09 ± 2.06 ²⁾⁴⁾	407.37 ± 40.37 ⁴⁾

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

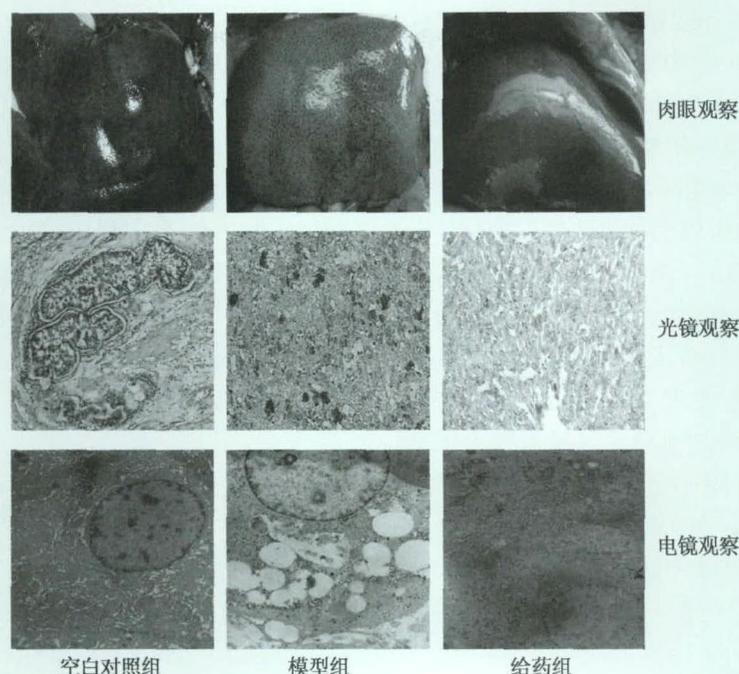


图1 MA对实验性动脉粥样硬化兔肝脏的影响

2.3.2 HE染色镜下组织学观察 空白对照组肝组织的形态学正常,肝小叶结构完整,未见脂肪变性的肝细胞。模型组肝组织均出现了肝细胞脂肪变性,病变以中央静脉周围最为明显,有成片的肝细胞呈泡沫样脂肪变性,以及灶性分布的大脂滴脂肪变性,病变区域出现肝细胞融合现象,部分肝细胞发生溶解性坏死。给药组可见肝小叶清晰、肝索明显,肝细胞基本

正常,少数肝细胞变大,胞浆内有少量脂滴沉着。

2.3.3 透射电镜观察 模型组兔肝脏有较多脂滴;与模型组比较,给药组肝脏脂滴明显减少。

2.4 MA对实验性动脉粥样硬化兔主动脉粥样硬化斑块的影响 用油红脂肪染色的方法可使主动脉粥样硬化区域脂肪呈鲜红色,用于观察动脉粥样硬化情况(图2)。

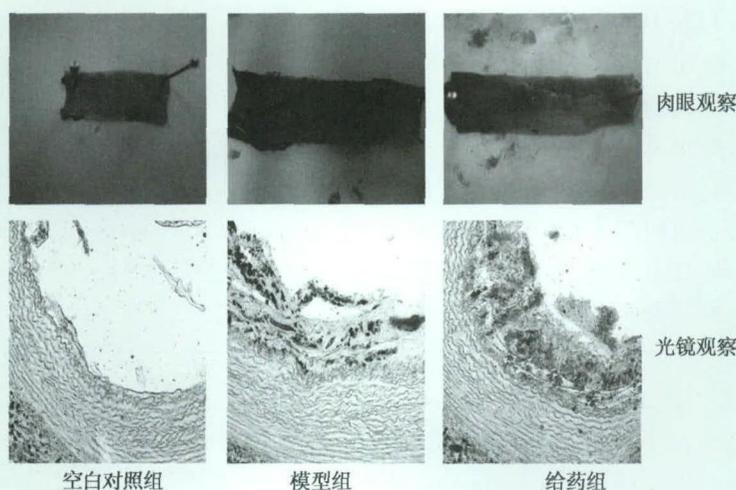


图2 MA对实验性动脉粥样硬化兔主动脉粥样硬化斑块的影响

2.4.1 肉眼观察 空白对照组主动脉内膜光滑,无红染的粥样硬化斑块形成;模型组主动脉内有较多的红染斑块,各给药组有少量的红染斑块。

2.4.2 光镜观察 冰冻切片油红染色结果显示:空白对照组主动脉内无红色的脂质沉积;模型组主动

脉内有大量的红色脂质沉积;给药组主动脉内红色脂质沉积少于模型组。

3 讨论

动脉粥样硬化是心脑血管疾病的主要病理学基

础,一般认为血浆 TC、TG 和 LDL 的水平与动脉粥样硬化发生呈正相关,而血浆 HDL 水平与动脉粥样硬化的发生呈负相关,高脂血症可促进动脉粥样硬化病变的形成和发展。课题组采用现代色谱学、现代波谱学等技术,以腹腔注射蛋黄乳液所致急性高脂小鼠为活性追踪模型,首次对贻贝的生物活性成分进行了系统研究^[7],从中分离得到了一种新的、具有显著调节血脂作用的单一多糖成分,命名为 MA。MA 是贻贝总多糖的主体成分,产率较高,占贻贝湿重的 0.49%;易溶于水和二甲亚砜,相对分子量为 112 739 u。笔者进一步采用实验性高脂血症大鼠模型和人试食实验观察了贻贝多糖的降脂作用,发现其能显著降低 TC、TG 和 LDL 水平^[6-8]。本实验利用喂养家兔高脂饲料方法建立的实验性动脉粥样硬化兔模型,再次证实 MA 可显著降低 TC、TG 和 LDL 水平,并发现 MA 可增强 LPL、HL 的活性。

LPL 和 HL 都是脂蛋白代谢中的关键酶。TG 被 LPL 水解后生成甘油和游离脂肪酸 (FFA) 供组织能量消耗或沉积于脂肪细胞,从而使血液中的 TG 和极低密度脂蛋白胆固醇 (VLDL-C) 的含量降低。HL 存在于肝内皮细胞表面,主要在 LDL 和 HDL 代谢中起重要作用^[9,10]。细胞内胆固醇的合成由 HMG-CoAR 催化完成,他汀类药物是 HMG-CoAR 竞争性抑制剂,使细胞内胆固醇合成减少,从而反馈上调肝细胞表面 LDL 受体表达,加速血浆中 LDL、MDL 及 VLDL 的清除,降低血脂水平。本实验结果表明,MA 可能通过增强 LPL、HL 的活性,降低 TC、TG 的水平,进而参与了降脂酶发挥降脂功能。但 MA 对 HMG-CoAR 没有显著影响。

油红属于偶氮染料,是很强的脂溶剂和染脂剂,与三酰甘油结合呈小脂滴状。当组织切片置入染液时,染料则离开染液而溶于组织内的脂质中,使组织内的脂滴呈橘红色。因此,油红染色法可显示组织内和动脉粥样硬化区域的脂肪。油红染色结果显

示,MA 组血管内膜较模型组完整、平坦,有少量红染的斑块,主动脉内红色脂质沉积颗粒少于模型组,表明 MA 抑制了动脉粥样硬化的形成。肝脏病理组织学和透射电子显微镜检测显示,MA 组肝细胞基本正常,肝脏中脂质沉积少于模型组,表明 MA 可抑制脂肪肝的形成。MA 的安全性高。吴涓等^[11]报道称贻贝多糖胶囊急性毒性分级属无毒级,无遗传毒性;有进一步研发成降脂、抗动脉粥样硬化的保健食品和药品的前景。

【参考文献】

- [1] 姚颖,魏江州,汪俊,等.厚壳贻贝多糖的提取和免疫学活性研究[J].第二军医大学学报,2005,26:896-899.
- [2] 徐红丽,郭婷婷,郭一峰,等.贻贝水溶性多糖 MP-1 的分离及体外抗肿瘤活性[J].第二军医大学学报,2006,27:998-1001.
- [3] Jung W K, Qian Z J, Lee Z J, et al. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide isolated from in vitro gastrointestinal digests of mytilus coruscus[J]. J Med Food, 2007, 10:197-202.
- [4] 刘志峰,李萍.贻贝提取物抗高血脂作用的观察[J].中国海洋药物,2001,20:9-10.
- [5] 明亮,邵伯芹,张艳,等.贻贝多活素对鹌鹑实验性动脉粥样硬化的影响[J].中国海洋药物,1996,12(6):554-557.
- [6] 储智勇,毛俊琴,李铁军,等.贻贝多糖对大鼠高脂血症的影响[J].解放军药学报,2008,24(3):213-215.
- [7] 马明华,易杨华,汤海峰.厚壳贻贝多糖 MA 的分离纯化、理化性质及活性研究[J].中国海洋药物,2004,4:14-18.
- [8] 李玲,储智勇,袁波,等.贻贝多糖胶囊辅助降血脂人体试食研究[J].中药材,2011,34(10):1645-1647.
- [9] 吴晓霞,李建科,刘迎利.蚕蛹油 α -亚麻酸对实验性高血脂大鼠的降脂作用[J].食品科学,2011,32(15):285-288.
- [10] 于竹芹,曾锋,徐新颖.羊栖菜对实验性高血脂大鼠血脂水平的调节作用[J].中国海洋药物杂志,2011,30(1):45-48.
- [11] 吴涓,孙倩,储智勇.贻贝多糖胶囊毒理学安全性研究[J].中国卫生检验杂志,2011,21(1):97-100.

【收稿日期】 2013-07-30 【修回日期】 2013-09-14

【本文编辑】 李睿旻

(上接第 26 页)

- [3] Gordon AN, Fleagle JT, Guthrie D, et al. Recurrent epithelial ovarian carcinoma: a randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin versus topotecan[J]. J Clin Oncol, 2001, 19(14):3312-3322.
- [4] Vandenput I, Amant F, Neven P, et al. Effectiveness of weekly topotecan in patients with recurrent epithelial ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2007, 17(1):83-87.
- [5] Abushahin F, Singh DK, Lurain JR, et al. Weekly topotecan for recurrent platinum resistant ovarian cancer[J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(1):53-57.
- [6] Herzog TJ, Sill MW, Walker JL, et al. A phase II study of two

topotecan regimens evaluated in recurrent platinum-sensitive ovarian, fallopian tube or primary peritoneal cancer: a gynecologic oncology group study (GOG 146Q)[J]. Gynecol Oncol, 2011, 120(3):454-458.

- [7] Sehoul J, Stengel D, Harter P, et al. Topotecan weekly versus conventional 5-day schedule in patients with platinum-resistant ovarian cancer: a randomized multicenter phase II trial of the North-Eastern German Society of Gynecological Oncology Ovarian Cancer Study Group[J]. J Clin Oncol, 2011, 29(2):242-248.
- [8] 刘勇,席青松,赵荆,等.两种方案治疗难治/耐药型小细胞肺癌比较[J].药物与临床,2011,30(5):598-601.

【收稿日期】 2013-12-11 【修回日期】 2014-01-08

【本文编辑】 李睿旻