

高脂血症大鼠 hepcidin 的表达异常及川芎嗪的干预研究

孙明月 郭春雨 王景尚 刘欣 张森 王琳 殷惠军

摘要 **目的** 探讨高脂血症大鼠铁调素 (hepcidin) 表达的变化及川芎嗪对其的干预效应。**方法** 40 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、肝素组及川芎嗪组 4 组, 每组 10 只。除空白对照组以普通饲料喂养外, 其余 3 组均以高脂饲料喂养。8 周后, 空白对照组及模型组给予生理盐水 $2\text{ml}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 肝素组和川芎嗪组分别给予肝素钠 $5\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、盐酸川芎嗪注射液 $40\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 腹腔注射, 连续 7 天。腹主动脉取血后分离血清, 生化法检测各组血脂, ELISA 法检测血清铁调素 (hepcidin)、白细胞介素 1 (IL-1)、白细胞介素 6 (IL-6) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的表达。**结果** 与空白对照组相比, 模型组、肝素组及川芎嗪组血脂均显著升高 ($P < 0.05$); 与空白对照组相比, 模型组血清 hepcidin、IL-1、IL-6 及 TNF- α 含量均显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 肝素组和川芎嗪组血清 hepcidin、IL-1、IL-6 及 TNF- α 含量均显著降低 ($P < 0.05$), 但肝素组素组下降更为明显。**结论** 随着血脂升高, 炎性因子及 hepcidin 呈现高表达状态, 应用川芎嗪后 hepcidin 水平下降, 炎性因子表达也下降, 说明川芎嗪具有抑制血清 hepcidin 高表达的作用, 这可能与其对炎性因子的抑制有关。

关键词 铁调素 川芎嗪 血脂代谢异常

中图分类号 R589

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.08.007

Study on Abnormal Expression of Hepcidin in Hyperlipidemia Rats and Effects of Tetramethylpyrazine on the Expression of Hepcidin. Sun Mingyue, Guo Chunyu, Wang Jingshang, et al. Xiyuan Hospital CACMS, Beijing 100091, China

Abstract **Objective** To observe the expression changes of hepcidin in hyperlipidemia rats and the effects of tetramethylpyrazine (TMP) on the expression of hepcidin. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into 4 groups: blank control group, model group, heparin group and TMP group. Except the blank control group, all other groups were fed with high-fat diet for 8 weeks. The blank control group and model group were injection with normal saline at $2\text{ml}/(\text{kg} \cdot \text{d})$. Rats in the TMP group were injected with TMP at $40\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, heparin at $5\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ was injected to those in the heparin treated group. After rats were given medicine for 7 days, the level of blood lipid, serum hepcidin, IL-1, IL-6 and TNF- α were detected. **Results** As compared with blank control group, the level of hepcidin, IL-1, IL-6 and TNF- α in serum was increased significantly in model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the level of hepcidin, IL-1, IL-6 and TNF- α in serum was obviously decreased in TMP group and heparin group ($P < 0.05$). **Conclusion**

Inflammatory factors and hepcidin expression was increased with improved blood lipid levels. After rats were given TMP, the level of serum hepcidin and Inflammatory factors were decreased. It is suggested that TMP showed obvious inhibition on high expression of hepcidin, and its inhibitory effect might be correlated to inhibiting Inflammatory factors.

Key words Hepcidin; Tetramethylpyrazine; Hyperlipemia

高脂血症是由脂质代谢或运转异常引起的全身性慢性炎症性疾病, 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的发生、发展中起着重要作用。铁调素 (hepci-

din) 是一种由肝细胞分泌后释放入血浆经尿液排出的细胞因子诱导的抗菌蛋白, 它是铁经肠黏膜吸收、由巨噬细胞回收、转移至肝储存的自我平衡调节器, 在铁代谢中起关键作用。

已有动物实验证明^[1], 铁过负荷可引起小鼠的血脂代谢紊乱, 但血脂代谢异常是否会对 hepcidin 的表达产生影响从而影响 AS 的进程, 尚未有充分的研究说明。肝素除抗凝作用外, 还可通过抑制平滑肌细胞迁移和增殖、调节血脂代谢、保护血管内皮等作用以抑制动脉粥样硬化的发生、发展^[2]。Poli 等^[3]发

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102845); 2013 年甘肃高校“飞天学者特聘计划”项目

作者单位: 100091 北京, 中国中医科学院西苑医院 (孙明月、郭春雨、王景尚、刘欣、张森、殷惠军); 730000 兰州, 甘肃中医学院 (王琳、殷惠军)

通讯作者: 殷惠军, 研究员, 博士生导师, 电子信箱: huijunyin@yeah.net

现,肝素可通过抑制 BMP/SMAD 及 JAK/ STAT 两条通路从而抑制 hepcidin 的表达,故本次研究采用肝素作为阳性对照。

川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)是中药川芎的根茎中提取的有效成分,化学结构为四甲基吡嗪,具有保护血管内皮、抗动脉粥样硬化、抗炎、抗激素硬化及抗血小板等作用,临床上广泛用于心脑血管疾病的治疗^[4]。因川芎嗪对 HepG2 细胞的增殖具有抑制作用,且本课题组前期已证实川芎嗪对 HepG2 细胞内的 hepcidin 具有抑制作用,故本次实验选用川芎嗪并研究其对体内 hepcidin 表达的影响,观察其抗动脉粥样硬化的作用是否与 hepcidin 的表达有关,并探索其机制^[5]。本研究通过给予高脂饮食大鼠不同处理后观察血清 hepcidin 表达的变化,探讨高脂血症对大鼠血清 hepcidin 表达的影响及川芎嗪对其干预作用,为高脂血症的发病机制及防治提供新的思路及科学依据。

材料与方法

1. 研究对象:实验动物:SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,体重 180~200g,4 周龄,购自北京斯贝福实验动物中心(许可证号:SCXK 京 2011-0004)。饲料:普通饲料购自北京科澳协力饲料有限公司,高脂饲料购自北京诺康源生物科技有限公司,配方为 1% 胆固醇、0.2% 胆酸盐、10% 猪油、10% 蛋黄粉及 78.8% 基础饲料。

2. 试剂及仪器:药物:盐酸川芎嗪注射液(北京市永康药业有限公司,批号:13070401),肝素钠注射液(常州千红生化制药股份有限公司,批号:130608)。主要试剂:生化检测甘油三酯(TG)及胆固醇(TC)试剂(购于北京万泰德瑞诊断技术有限公司,批号分别为:ZL3103AA21 及 ZL3103AA22),大鼠血清铁调素(hepcidin)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 1(IL-1)及白细胞介素 6(IL-6)ELISA 试剂盒(购于 AMEKO 公司,批号:201312)。主要仪器:UV-2000 型紫外分光光度计(上海市尤尼柯公司),352 型酶标仪(芬兰 Lab-systems Multiskan MS 公司),AC8 型洗板机(芬兰 Thermo Lab-systems 公司),GNP-9080 型隔水式恒温培养箱(国产),高速冷冻离心机(Sigma 3-18k),CS-T300 型全自动生化分析仪(长春迪瑞医疗科技股份有限公司)。

3. 方法:(1)高脂血症模型的制备:40 只大鼠均适应性喂养普通饲料 1 周后,随机抽取 10 只以普通饲料喂养 8 周设为空白对照组。将剩余 30 只随机分为 3 组,每组 10 只,均以高脂饲料喂养 8 周。(2)分组及给药:空白对照组及模型组大鼠喂养 8 周后,给予生理盐水 2ml/(kg·d)腹腔注射;肝素阳性对照组高脂喂养 8 周后给予肝素钠注射液 5mg/(kg·d)腹腔注射;川芎嗪组高脂喂养 8 周后给予盐酸川芎嗪注射液 40mg/(kg·d)腹腔注射,各组注射均连续 7 天。所有大鼠在

高脂和普通饲料分组后,实验过程中饲养条件不发生改变。(3)取材:空白对照组及模型组大鼠于喂养 4 周时,分别于眼眶取血 2ml,在室温下静置 1h 后,经过高速冷冻离心机离心,3000r/min,离心 15min,吸取上层血清,待测。各组大鼠添加药物 7 天后,禁食不禁水 8h,7% 水合氯醛 5ml/kg 腹腔注射,在麻醉状态下沿腹正中中线切开胸腹部,推开腹腔脏器,暴露腹主动脉,10ml 注射器穿刺取血置于促凝采血管中,并将在取血时发生凝血、溶血的血样废弃,其中包括空白对照组 2 只、模型组 3 只、肝素组 2 只及川芎嗪组 2 只大鼠的血样,其余于室温静置 1h 后高速冷冻离心机离心,3000r/min,离心 15min,吸取上层血清,待测。取血后立即分离肝脏,根据标准组织切片技术,固定于 4% 多聚甲醛中。

4. 各项指标的测定:大鼠血清测定以下指标:全自动生化分析仪测定血脂指标,包括 TG、TC;大鼠血清 hepcidin、TNF- α 、IL-1 及 IL-6,测定方法及步骤按试剂盒说明书进行操作。

5. 肝组织病理学检测:肝组织固定 7 天后,进行石蜡包埋,制作组织切片及 HE 染色,用于肝组织形态学观察。

6. 统计学分析:采用 SPSS 19.0 软件进行统计学处理,各项检测指标中服从正态分布者以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组组间比较采用独立样本 t 检验,多组均数之间的差异显著性检验采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠血脂水平比较:与空白对照组(9 周)相比,模型组(9 周)、肝素对照组及川芎嗪组的血清胆固醇均升高,模型组(9 周)及川芎嗪组的甘油三酯均升高($P < 0.05$);与空白对照组(4 周)相比,模型组(4 周)的血清胆固醇升高($P < 0.05$),详见表 1。

表 1 各组大鼠血清 TC、TG 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间(周)	<i>n</i>	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)
空白对照组	4	10	1.77 $\pm$ 0.14 [*]	0.94 $\pm$ 0.38 [*]
空白对照组	9	8	2.07 $\pm$ 0.18 [*]	1.03 $\pm$ 0.27 [*]
模型组	4	10	2.31 $\pm$ 0.36 [*]	0.95 $\pm$ 0.26 [*]
模型组	9	7	3.73 $\pm$ 0.45 [#]	1.32 $\pm$ 0.10 [#]
肝素对照组	9	8	3.55 $\pm$ 0.53 [#]	1.28 $\pm$ 0.12 [*]
川芎嗪组	9	8	3.62 $\pm$ 0.86 [#]	1.31 $\pm$ 0.28 [*]

与空白对照组(9 周)比较,[#] $P < 0.05$;与模型组(9 周)比较,^{*} $P < 0.05$

2. 肝组织病理改变:HE 染色后镜下可见,空白对照组的肝小叶和肝细胞索结构清晰,细胞排列整齐,细胞中央有大而圆的核,细胞质均匀;模型组肝组织小叶结构欠清,明显可见弥漫性大小不一的圆形脂肪空泡,伴有水样变性、炎性细胞浸润及凋亡的肝细胞;肝素组及川芎嗪组的脂肪样变则明显改善,见图 1。

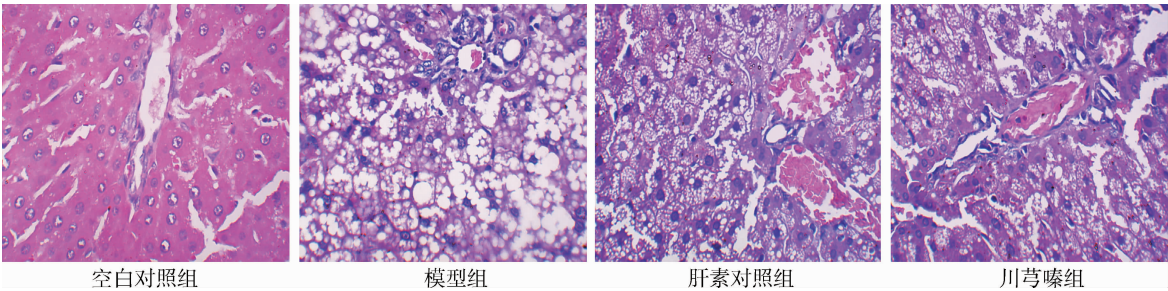


图 1 肝组织病理改变 (HE, ×200)

3. 川芎嗪对高脂血症大鼠血清 hepcidin 的影响: 与空白对照组(4 周)比较,模型组(4 周)的 hepcidin 的表达升高($P<0.05$);与空白对照组(9 周)比较,模型组(9 周)hepcidin 表达显著升高($P<0.05$);与模型组(4 周)比较,模型组(9 周)hepcidin 表达的值升高($P<0.05$);肝素对照组与川芎嗪组 hepcidin 表达的值与空白对照组(9 周)比较,差异无统计学($P>0.5$);与模型组(9 周)比较,肝素对照组与川芎嗪组 hepcidin 表达的值均降低($P<0.05$),详见表 2。

4. 川芎嗪对高脂血症大鼠血清 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1$ 及 $IL-6$ 的影响:与空白对照组(9 周)相比,模型组(9 周)的血清 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1$ 及 $IL-6$ 均升高($P<$

表 2 各组血清 hepcidin 的比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	时间(周)	n	hepcidin($\mu\text{g/L}$)
空白对照组	4	10	130.90 $\pm$ 12.90 [#]
空白对照组	9	8	132.76 $\pm$ 13.24 [#]
模型组	4	10	138.95 $\pm$ 20.88 [#]
模型组	9	7	156.51 $\pm$ 24.95 [*]
肝素对照组	9	8	121.17 $\pm$ 13.34 [#]
川芎嗪组	9	8	127.74 $\pm$ 14.98 [#]

与空白对照组(9 周)比较,^{*} $P<0.05$;与模型组(9 周)比较,[#] $P<0.05$

0.05);与模型组(9 周)相比,肝素对照组与川芎嗪组的血清 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1$ 及 $IL-6$ 均降低($P<0.05$),详见表 3。

表 3 各组大鼠血清 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1$ 及 $IL-6$ 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间(周)	n	$TNF-\alpha$ (ng/L)	$IL-1$ (ng/L)	$IL-6$ (ng/L)
空白对照组	9	8	52.75 $\pm$ 7.88 [#]	179.31 $\pm$ 15.78 [#]	28.32 $\pm$ 0.90 [#]
模型组	9	7	58.99 $\pm$ 4.39 [*]	199.11 $\pm$ 12.64 [*]	32.76 $\pm$ 0.94 [*]
肝素对照组	9	8	50.86 $\pm$ 9.08 [#]	166.38 $\pm$ 21.58 [#]	25.00 $\pm$ 1.25 [#]
川芎嗪组	9	8	52.13 $\pm$ 9.14 [#]	173.24 $\pm$ 25.80 [#]	27.85 $\pm$ 0.90 [#]

与空白对照组(9 周)比较,^{*} $P<0.05$;与模型组(9 周)比较,[#] $P<0.05$

讨 论

机体铁稳态对生命体的新陈代谢平衡起至关重要的作用,hepcidin 对于铁稳态的维持有着重要的意义,有许多疾病的致病机制也与 hepcidin 的异常表达相关。研究显示,调控 hepcidin 表达的信号通路中较重要的是转化生长因子超家族的 BMP/SMAD 信号通路以及 JAK /STAT 信号通路,炎症因子可通过 JAK /STAT 信号通路来调控 hepcidin 的表达,且 JAK /STAT 通路对 hepcidin 的调控依赖于 SMAD4 的存在^[6]。

随着铁代谢与 AS 的相关性研究逐渐增多,铁在 AS 进展中的促进作用已得到证实,主要表现为:在 AS 的初期就已出现斑块内铁沉积增多,通过限铁饮

食或铁螯合剂治疗则可减少铁沉积、改善 AS 及斑块的稳定性。而 hepcidin 可在 AS 的斑块中高表达,主要表达于巨噬细胞及平滑肌细胞,其可促进斑块的不稳定性,并使巨噬细胞内的铁沉积增多^[7,8]。通过上述,可知 hepcidin 与 AS 斑块内的铁沉积及斑块稳定性密切相关,但尚未有研究探索 AS 发生、发展中血清 hepcidin 的表达情况及其机制。

本研究通过建立高脂模型,观察血脂变化对血清 hepcidin 表达的影响;采用已知对 hepcidin 有明显抑制作用的肝素做为阳性对照,观察川芎嗪对高脂大鼠 hepcidin 表达的影响。通过对不同时间段的血脂及血清 hepcidin 的检测发现,与空白对照组(9 周)比较,模型组(9 周)、肝素对照组与川芎嗪组的血脂均

升高,说明肝素及川芎嗪对血脂无明显降低作用,而血清 hepcidin 的表达随着血脂的升高而升高,此结果表明血清 hepcidin 的表达与血脂升高呈正相关,与此同时炎症因子 IL-1、IL-6 及 TNF- α 的表达均增加,说明炎症与 hepcidin 的表达在高脂血症中有着密切联系。

已有大量研究表明,炎症在 AS 的发生、发展过程中起着重要作用,IL-1、IL-6 及 TNF- α 等炎症因子可作为 AS 的炎症标志物及风险预测因子,炎症因子可损伤血管内皮,激活机体免疫反应,促进巨噬细胞在内膜下增殖,导致泡沫细胞增加,促进斑块的形成。炎症因子可诱导 hepcidin 的表达,包括 IL-1、IL-6 及 TNF- α ,其中对 IL-6 的研究最为深入,其可通过刺激 JAK/STAT 信号通路来调控铁调素的表达^[9-11]。故推测 hepcidin 表达的升高可能与高脂血症的炎症状态有关,且炎症因子可促进巨噬细胞增殖,使膜铁转运蛋白降解而导致铁沉积增多,从而进一步促进 AS。

根据实验结果可知,川芎嗪组与肝素对照组的 hepcidin 的含量均显著低于模型组(9周),同时两组血清 IL-1、IL-6 及 TNF- α 表达均降低,但肝素对照组的各项指标下降更为明显。川芎嗪组血清 hepcidin 的含量显著低于模型组(9周),说明其对高表达的 hepcidin 具有明显的抑制作用,这与本课题组前期的细胞实验结果相一致,从而进一步证实了川芎嗪对 hepcidin 高表达的抑制作用,同时川芎嗪组的血清 IL-1、IL-6 及 TNF- α 表达均降低,而川芎嗪的抗炎作用已通过多个研究证实,故川芎嗪可能通过抑制 IL-1、IL-6 及 TNF- α 等炎症因子的表达而影响 hepcidin 的炎症相关通路,最终抑制了血清 hepcidin 的表达^[12,13]。通过本研究显示,川芎嗪与肝素对炎症因子及 hepcidin 高表达均有明显抑制作用,但川芎嗪对炎症因子及 hepcidin 高表达的抑制作用尚不及肝素。

本研究结果显示,高脂血症可引起 hepcidin 的表达升高,川芎嗪与肝素对炎症因子及 hepcidin 高表达均有明显抑制作用,这提示川芎嗪及肝素可能通过其抗炎作用以抑制 hepcidin 的高表达,从而进一步发挥其抗动脉粥样硬化及防治冠心病的作用。然而,体内

脂质代谢与 hepcidin 表达之间可能存在复杂的联系,现有研究尚存在争议,川芎嗪对 hepcidin 高表达的抑制作用亦可能存在对其他通路的影响,本课题组将对其机制及不同剂量的川芎嗪对 hepcidin 及相关指标的影响进行更深入的研究。

参考文献

- 1 王洁.铁过负荷对小鼠血脂代谢及相关细胞因子作用研究[D].上海:第二军医大学,2013;30-32
- 2 许富康,郭航远.肝素抗动脉粥样硬化研究进展[J].浙江实用医学,2010,10(15):407-408,415
- 3 Poli M, Girelli D, Camprostrini N, *et al.* Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo[J]. Blood, 2011,117(3):997-1004
- 4 钱超.川芎嗪对心血管的药理作用[J].内蒙古中医药,2014,8(23):107-108
- 5 张加军,邢国辉,王继伟,等.川芎嗪对人肝癌 HepG2 细胞的影响及与突变型 P53 蛋白表达的影响[J].中国中医药现代远程教育,2013,9(11):157-159
- 6 常春康,张曦,肖超,等.铁调素的表达与调节机制研究进展[J].中国实验血液学杂志,2012,20(4):1030-1033
- 7 Minqin R, Rajendran R, Pan N, *et al.* The iron chelator desferrioxamine inhibits atherosclerotic lesion development and decreases lesion iron concentrations in the cholesterol-fed rabbit[J]. Free Radic Biol Med,2005,38(9):1206-1211
- 8 Li JJ, Meng X, Si HP, *et al.* Heparin destabilizes atherosclerotic plaque via overactivating macrophages after erythrophagocytosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2012,32(5):1158-1166
- 9 Huang H, Lamikanra AA, Alkaitis MS, *et al.* Interleukin-10 regulates hepcidin in plasmodium falciparum malaria[J]. PLoS One, 2014,9(2):e88408
- 10 Song SN, Iwahashi M, Tomosugi N, *et al.* Comparative evaluation of the effects of treatment with tocilizumab and TNF- α inhibitors on serum hepcidin, anemia response and disease activity in rheumatoid arthritis patients[J]. Arthritis Res Ther,2013,15(5):R141
- 11 Richard R, Chun LJ, Gabayan V, *et al.* Heparin induction by pathogens and pathogen-derived molecules is strongly dependent on interleukin-6[J]. Infect Immun,2014,82(2):745-752
- 12 母传贤,刘国玲,田华,等.川芎嗪对胶原性关节炎大鼠血清 IL-1、IL-6、IL-2 水平及关节浸液 NO、PGE₂ 的影响[J].中国中西医结合杂志,2014,2(34):214-217
- 13 刘国玲,芦琨,郭辉,等.川芎嗪对大鼠胶原性关节炎及免疫功能的影响[J].中药药理与临床,2014,30(1):52-55

(收稿日期:2015-01-06)

(修回日期:2015-01-26)