

·基础研究·

矢车菊素-3-葡萄糖苷抑制ApoE^{-/-}小鼠血小板趋化因子及白细胞表面受体

姚艳玲^{1,2}, 张献丹³, 牙甫礼^{1,2}, 陈彬林^{1,2}, 李卿^{1,2}, 杨燕^{1,2,4}

(1. 中山大学公共卫生学院营养学系, 广东广州 510080; 2. 广东省营养与膳食健康重点实验室, 广东广州 510080; 3. 广西壮族自治区人民医院营养科, 广西南宁 530000; 4. 中山大学公共卫生学院(深圳), 广东深圳 510006)

摘要:【目的】探讨不同剂量的植物化学物花色苷活性成分矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cy-3-g)对ApoE^{-/-}小鼠血小板来源的趋化因子及白细胞受体表达的抑制作用。【方法】75只8周龄ApoE^{-/-}雄性小鼠随机分为5组, 每组15只, 分别用添加200 mg/kg(低)、400 mg/kg(中)、800 mg/kg(高)三个剂量Cy-3-g的高脂饲料喂养, 标准饲料和高脂饲料分别为对照组和高脂组。实验周期为16周。每周记录小鼠体质量变化和摄食量, 实验末期用试剂盒测定血脂四项水平, 分离小鼠颈动脉切片后做油红O染色, ELISA法测定血清中MIF, CXCL12及CCL2的水平, 流式细胞仪测定白细胞表面CXCR4、CXCR7的表达, 同时进行尾部出血时间测定。【结果】与高脂组比较, 中、高剂量Cy-3-g降低了小鼠的血脂水平($P<0.05$); 高剂量Cy-3-g显著降低了小鼠颈动脉斑块面积($P<0.05$); 所有Cy-3-g干预组血清中趋化因子CXCL12、CCL2水平显著降低($P<0.002$); 中、高剂量Cy-3-g组白细胞表面受体CXCR4、CXCR7明显降低($P<0.05$); 各组小鼠出血时间无显著差异($P>0.05$)。【结论】在不造成出血风险的前提下, 花色苷Cy-3-g能显著抑制ApoE^{-/-}小鼠血清中趋化因子CXCL12、CCL2及白细胞上相应受体CXCR4、CXCR7的水平。

关键词: 血小板趋化因子; 趋化因子受体; 花色苷; 动脉粥样硬化; APOE基因敲除小鼠

中图分类号: R151.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2018)02-0171-07

Cyanidin-3-glucoside Inhibits Platelet-Derived Chemokines and Their Receptors on Leukocytes of ApoE^{-/-} mice

YAO Yan-ling^{1,2}, ZHANG Xian-dan³, YA Fu-li^{1,2}, CHEN Bin-lin^{1,2}, LI Qing^{1,2}, YANG Yan^{1,2,4}

(1. Department of Nutrition, School of Public Health, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Food, Nutrition and Health, Guangzhou 510080, China; 3. Nutritional Department of The People's Hospital of Guangxi Autonomous Region, Nanning 530000, China; 4. School of Public Health(Shenzhen), Sun Yat-sen University, Shenzhen 510006, China)

Corresponding to: YANG Yan; E-mail: yangyan3@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of different doses of anthocyanins Cy-3-g on serum lipids, platelet-derived chemokines, including MIF and CXCL12 together with their receptors CXCR4 and CXCR7. 【Methods】Male ApoE^{-/-} mice were distributed to 5 groups ($n=15$ per group), and fed with standard diet, high fat diet (HFD), HFD with 200 mg/kg Cy-3-g (low), HFD with 400 mg/kg Cy-3-g (middle), HFD with 800 mg/kg Cy-3-g (high) respectively for 16 weeks. The changes of body weight and food intake were recorded weekly. At the end of the experiment term, the serum lipids (triglyceride, cholesterol, HDL-C, LDL-C) were detected by kits. Arteries were separated to determine plaque histology by Oil-Red-O stain. MIF, CXCL12 and CCL2 in serum were detected by ELISA kits. The expression of CXCR4 and CXCR7 on the surface of leukocytes were tested via flow cytometry. Tail bleeding time was measured mean-

收稿日期: 2017-11-01

基金项目: 国家自然科学基金(81573145, 81372978); 广东省科技计划项目(2015A050502020)

作者简介: 姚艳玲, 硕士, 研究方向: 植物化学物对血小板病理功能的影响, E-mail: 736937596@qq.com; 杨燕, 通信作者, 教授, 博士, 研究方向: 营养与慢性非传染病的预防, E-mail: yangyan3@mail.sysu.edu.cn

while. 【Results】 Compared with the HFD group, the levels of serum lipids in medium (400 mg/kg) and high (800 mg/kg) Cy-3-g groups were significantly decreased ($P<0.05$). The plaque area of carotid artery was decreased in high Cy-3-g group ($P<0.05$). Cy-3-g at all doses significantly reduced the serum concentrations of CXCL12 and CCL2 ($P<0.002$). Cy-3-g of medium (400 mg/kg) and high (800 mg/kg) dose significantly inhibited the expression of CXCR4 and CXCR7 on leukocyte surface ($P<0.05$). Cy-3-g does not prolong the tail bleeding time. 【Conclusions】 Anthocyanin Cy-3-g inhibits chemokine CXCL12, CCL2 in serum, and the expression of CXCR4 and CXCR7 on leukocytes without bleeding risk in ApoE^{-/-} mice.

Key words: platelet-derived chemokines; chemokine receptor; anthocyanins; atherosclerosis; ApoE gene knocked-out mice

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(2): 171-177]

近年来,心血管疾病(cardiovascular diseases, CVD)已成为人类健康的首要威胁,其中以血管内膜形成粥样或纤维斑块为特征的动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心肌梗死、心力衰竭、脑卒中等多种缺血性CVD发生的共同病理学基础^[1]。血小板在凝血止血、炎症反应及器官移植排斥等生理和病理过程中有重要作用。研究表明,血小板作为一种重要的炎症细胞,通过激活、黏附、聚集、颗粒释放、分泌炎症趋化因子和凋亡等活动,在AS的发生、发展和斑块形成等过程中都发挥着重要作用^[2-3],因此,对血小板在动脉粥样硬化中功能的研究不容忽视。血小板颗粒物中包含多种趋化因子(chemokine),如CXCL4(PF4)、CXCL5(ENA-78)、CXCL7(NAP-2)、CXCL12(SDF-1 α)、CCL2(MCP-1)、CCL5(RANTES)、MIF(macrophage migration inhibitory factor)等^[4]。血小板来源的趋化因子CXCL12、MIF及CCL2不仅具有趋化单核巨噬细胞的作用,还能够通过引起血管内皮平滑肌细胞增殖,增加斑块不稳定性等方式全程参与动脉粥样硬化的发生与发展,与动脉粥样硬化的多种并发症密切相关^[5-6]。它们可通过与白细胞、内皮细胞等炎症细胞表面相应受体CXCR4、CXCR7等结合来实现破损内皮对炎症细胞的招募^[7]。因此,这些血小板趋化因子及受体有望成为抑制AS炎症病变的重要靶点。近年来,由于阿司匹林等临床常用的抗血小板药物被发现有增加出血、胃溃疡等风险的副作用,所以目前对于AS的早期治疗以及长期抗炎治疗中抗血小板药物的运用是受到很大限制的。植物化学物花色苷(anthocyanin)是广泛存在于植物中的水溶性天然色素。其中,矢车菊素-3-葡萄糖苷(cyanidin-3-glucoside, Cy-3-g)是花色苷类中主要的生物活

性成分。流行病学研究显示,富含植物花色苷食物的摄入与CVD的发病呈负相关^[8],具有显著的抗炎、抗氧化、抗血小板、调节血脂以及改善内皮功能等作用^[9]。本课题组前期研究表明,花色苷可体外有效抑制血小板的活化和聚集以及抑制血栓的形成,同时高剂量(50 $\mu\text{mol/L}$)的使用也不造成出血风险^[10];通过体内动物实验证实了膳食摄入黑米花色苷的提取物可以有效降低因高脂膳食诱导的大鼠血小板高反应性^[11]。而在血小板趋化因子方面,近期有研究发现,花色苷纯品(Cy-3-g和Dp-3-g)可显著抑制高胆固醇血症患者体内血小板 α 颗粒的释放以及CXCL5、CXCL7、CXCL8、CXCL12等趋化因子的分泌^[12-13];但是,目前还鲜有报道花色苷Cy-3-g单体对动脉粥样硬化中血小板趋化因子及其受体的作用研究。综上,本研究将选用可自发形成动脉粥样硬化病变的ApoE^{-/-}小鼠作为实验对象,探讨不同剂量Cy-3-g对ApoE^{-/-}小鼠血小板趋化因子MIF、CCL2、CXCL12的抑制作用及对白细胞表面相应受体CXCR4、CXCR7的抑制作用,并进一步阐明其可能的机制,从而为将血小板趋化因子作为长期防治AS炎症的靶点提供重要的理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6周龄健康ApoE^{-/-}雄性小鼠,体质量18~22 g,购自常州卡文斯实验动物中心,在公共卫生学院SPF级动物实验中心经过适应性饲养2周后,开展花色苷干预实验。动物许可证号为SCXK(粤)2013-0002。

1.2 主要试剂及仪器

Sepharose 2B、哌嗪-1,4-二乙磺酸(piperazine-1,4-Bisethanesulfonic acid, PIPES; 美国 Sigma 公司), 小鼠 PE-CXCR4、APC-CXCR7、FITC-CD45 及同型 IgG 流式抗体(美国 R&D 公司), 小鼠 CXCL12、MIF 及 CCL2 酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒(英国 Abcam 公司), 1X 红细胞裂解液(美国 Ebioscience 公司), 单试剂 GPO-PAP 法甘油三酯、总胆固醇测定试剂盒、双试剂直接法 LDL-C、HDL-C 测定试剂盒(南京建成生物研究所), CytoFLEX 流式细胞仪(美国 BECHMAN 公司)、荧光酶标仪(瑞士 TECAN 公司), 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.3 花色苷单体制备

黑米的糊粉层通过磨皮机收集后,经乙醇溶解过滤、石油醚萃取、大孔树脂吸附洗脱后,冷冻干燥得到花色苷粗提物(纯度约 80%),使用中效液相色谱分离纯化得到花色苷 Cy-3-g 单体,纯度在 95% 以上。

1.4 动物分组及干预

75 只 8 周龄雄性健康 ApoE^{-/-}小鼠,随机分为 5 组,每组 15 只,饲料条件分别为:AIN-93G 标准饲料(对照组)、M12015 高脂饲料(高脂组,含 21% 脱水乳脂、0.15% 胆固醇)、高脂饲料+200 mg/kg Cy-3-g(低剂量组)、高脂饲料+400 mg/kg Cy-3-g(中剂量组)、高脂饲料+800 mg/kg Cy-3-g(高剂量组)。饲养过程中每天观察小鼠的一般状况和摄食量,每周称量一次体质量,实验周期为 16 周。

1.5 小鼠血清血脂水平的测定

实验末期,每组取 8 只小鼠,股静脉穿刺取非抗凝血,常温 3000 r/min($r = 8$ cm)离心 15 min 后取上清,依照试剂盒说明书检测血清血脂四项,即甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL-C)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL-C)水平。

1.6 小鼠颈动脉斑块的观察和测定

实验末期,腹腔注射 0.1 g/mL 水合氯醛麻醉小鼠,每组取 3 只小鼠,显微镜下剥离小鼠颈总动脉,结扎后取材制作 5 μ m 冰冻切片。切片用油红 O 染色颈动脉中分布的动脉斑块,镜下观察拍片后用 IMAGE J(1.46 版)软件分析斑块面积。

1.7 小鼠血清血小板趋化因子水平的检测

实验末期,腹腔注射 0.1 g/mL 水合氯醛麻醉小鼠,行心脏采血。小鼠全血常温 3000 r/min($r = 8$ cm)离心 15 min 后取上清,每组取 8 只小鼠的血清,通过 ELISA 免疫检测法测定血清中 CXCL12、MIF 和 CCL2 的水平,具体操作步骤参照说明书。

1.8 小鼠白细胞表面趋化因子受体表达的情况

每组取 4 只小鼠的抗凝全血,用 PBS 适当稀释混匀,加入终浓度为 100 μ mol/L 的 ADP 激活血小板^[14]。40 g/L 的多聚甲醛溶液固定,裂解红细胞,PBS 洗脱红细胞碎片后,避光加入 FITC-CD45 流式抗体标记白细胞,以及 PE-CXCR4 和 APC-CXCR7 抗体标记白细胞表面趋化因子受体,室温避光孵育 15 min 后,用流式细胞仪检测白细胞表面趋化因子受体的表达。

1.9 小鼠出血时间测定

每组取 10 只小鼠,麻醉后剪尾 2 mm,立即将尾部放入 37 $^{\circ}$ C 生理盐水中进行出血时间测定。具体步骤和评价参照国际标准方法^[10]。

1.10 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,结果以均数 \pm 标准差表示,组间均数比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间不同阶段摄食量均数的比较采用重复测量方差分析(repeated measures ANOVA),组间两两比较使用 Bonferroni 方法, $P < 0.05$ (双侧)时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 花色苷 Cy-3-g 对 ApoE^{-/-}小鼠摄食量和体质量变化的影响

各组小鼠的摄食量情况见表 1,经分析组间差异无统计学意义($P = 0.181$)。喂饲期间,未发现小鼠摄食及行为异常。小鼠的体质量变化情况如图 1 所示,经过 16 周的饲养,高脂组小鼠的体质量增量约为对照组增量的 3.2 倍,并且组间差异具有统计学意义($P = 0.003$)。随着 Cy-3-g 干预剂量的升高,体质量增长幅度逐渐降低,但是与高脂组相比体质量增长量差异无统计学意义($P > 0.05$)。

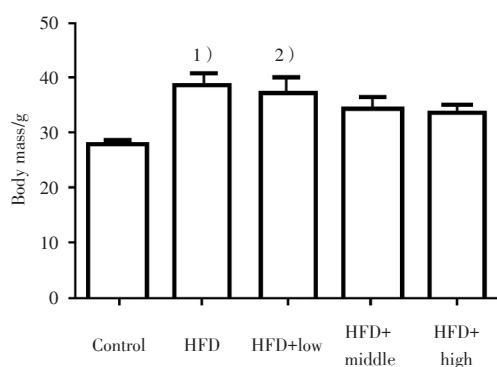
2.2 花色苷 Cy-3-g 对 ApoE^{-/-}小鼠血脂的影响

如图 2,与对照组相比,高脂组的 TG ($P =$

表1 ApoE^{-/-}小鼠饲养期间摄食情况Table 1 The diet intake of ApoE^{-/-} mice($\bar{x} \pm s, n=75$)

Group	t/weeks			
	4	8	12	16
Control	3.71±0.29	3.72±0.32	3.30±0.23	3.21±0.18
HFD	3.66±0.21	3.96±0.48	3.91±0.28	3.99±0.28
HFD+low	3.79±0.68	4.07±0.38	3.73±0.34	3.97±0.13
HFD+middle	4.15±0.22	3.91±0.19	3.73±0.26	3.78±0.12
HFD+high	3.83±0.40	4.33±0.36	3.74±0.26	3.55±0.47

HFD: high fat diet; repeated measures ANOVA between groups, $n=15/\text{group}$, $F_{\text{group}}=1.739$, $P=0.181$; $F_{\text{time}}=1.325$, $P=0.263$; $F_{\text{group} \times \text{time}}=1.815$, $P=0.166$.



The body mass change during the experiment period showed that the HFD group and all three Cy-3-g groups had a significant increase of body mass compared to the control group. $n=15/\text{group}$, $F=5.414$, $P=0.0008$. By Bonferroni test after One-way ANOVA, 1) $P<0.001$ vs the control group; 2) $P<0.05$ vs the control group.

图1 ApoE^{-/-}小鼠16周后体质量变化情况Fig.1 The body weight of ApoE^{-/-} mice after 16 weeks

0.001)和TC($P=0.002$)水平显著升高,组间有统计学差异,说明高脂血症小鼠造模成功。与高脂组相比,高剂量Cy-3-g组的TG、TC水平都受到抑制,组间差异具有统计学意义(TG: $P=0.003$; TC: $P=0.001$);中剂量组($P=0.014$)、高剂量组($P=0.011$)的LDL-C水平明显降低,组间差异具有统计学意义;而HDL-C水平在高剂量Cy-3-g干预组升高,与高脂组相比差异具有统计学意义($P=0.006$)。

2.3 花色苷Cy-3-g对ApoE^{-/-}小鼠颈动脉斑块面积的影响

与对照组相比,高脂组小鼠的颈动脉斑块形

成程度及面积明显增加($P=0.007$),说明小鼠动脉粥样硬化造模成功。与高脂组相比,仅高剂量Cy-3-g组小鼠的颈动脉斑块面积减少量有统计学差异($P=0.023$),如图2。

2.4 花色苷Cy-3-g对ApoE^{-/-}小鼠血清中趋化因子CXCL12、MIF及CCL2水平的影响

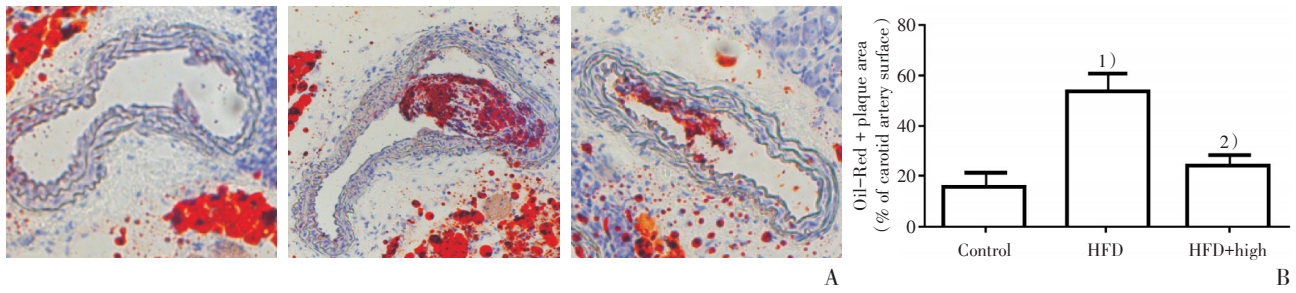
与高脂组相比,各剂量的Cy-3-g组血清CXCL12的水平均明显受到抑制,并且组间差异具有统计学意义($P<0.001$);中、高剂量Cy-3-g组表现出MIF水平降低的趋势,但差异没有统计学意义($P=0.072$);与高脂组相比,各剂量Cy-3-g组中CCL2水平有减少趋势,并且中、高剂量组的差异具有统计学意义(中剂量 $P<0.01$;高剂量 $P<0.001$),见表2。

2.5 花色苷Cy-3-g对ApoE^{-/-}小鼠白细胞表面CXCR4、CXCR7表达水平的影响

与高脂组相比,中、高剂量Cy-3-g组可明显抑制白细胞表面CXCR4表达,并且组间差异具有统计学意义(中剂量 $P=0.026$;高剂量 $P=0.006$);对于另一受体CXCR7,与高脂组相比,中、高剂量Cy-3-g组可明显降低其白细胞表面的表达量,并且差异具有统计学意义(中剂量 $P=0.030$;高剂量 $P=0.014$),如图3。

2.6 花色苷Cy-3-g对ApoE^{-/-}小鼠出血时间的影响

各组小鼠断尾出血时间的测定结果显示,各剂量组与对照组相比,无明显变化,差异无统计学意义($P=0.643$),如图4。



A: Representative photographs of Oil-Red-O-stained atherosclerotic areas from each group (Left: control groups; Middle: HFD group; Right: HFD+high Cy-3-g group). Original magnification $\times 200$. B: The quantitative analysis of the plaque area. $n=3$ /group, $P=0.0056$, $F=13.92$, 1) $P<0.01$ vs the control group; 2) $P<0.05$ vs HFD group by Bonferroni test after One-way ANOVA.

图2 Cy-3-g对 ApoE^{-/-}小鼠颈动脉斑块的影响

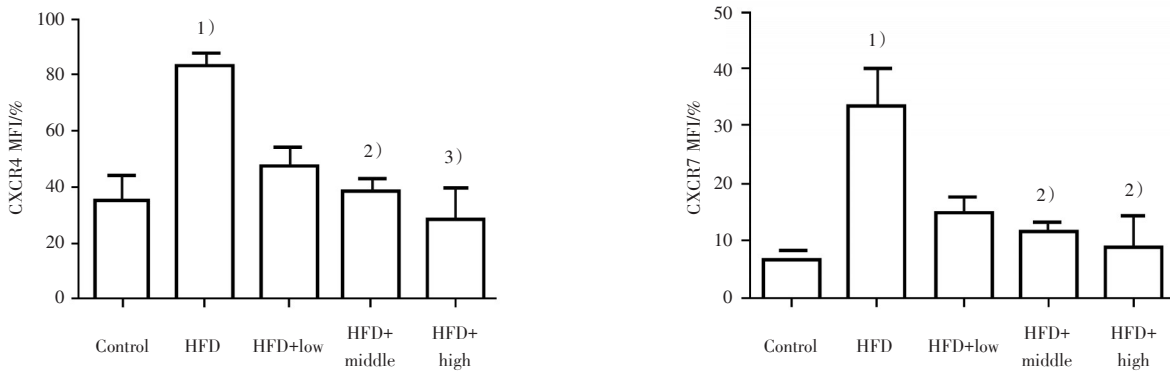
Fig.2 The effects of Cy-3-g on atherosclerotic lesion phenotype in carotid artery of ApoE^{-/-} mice

表2 Cy-3-g对 ApoE^{-/-}小鼠血脂水平的影响

Table 2 The effects of Cy-3-g on the the serum lipid profiles of ApoE^{-/-} mice

	Group					P value
	Control	HFD	HFD+200 mg/kg Cy-3-g	HFD+400 mg/kg Cy-3-g	HFD+800 mg/kg Cy-3-g	
TG	1.58±0.65	5.13±1.66 ¹⁾	3.66±1.18	3.10±0.83	2.02±1.00 ²⁾	0.001
TC	8.29±1.75	11.99±1.09 ¹⁾	11.13±1.14	10.11±1.52	7.90±0.89 ²⁾³⁾	0.001
LDL-C	8.58±3.66	12.87±3.81	10.28±2.28	6.47±1.71 ²⁾	6.28±1.25 ²⁾	0.005
HDL-C	1.87±0.92	0.98±0.77	1.75±0.30	2.27±1.00	5.93±2.27 ²⁾	0.005

HFD: high fat diet; $n=8$ /group, $F=7.906$, 9.026 , 5.074 and 7.336 for TG, TC, LDL and HDL respectively, 1) $P<0.05$ vs the control group; 2) $P<0.01$ vs HFD group; 3) $P<0.01$ vs the low dose Cy-3-g group by Bonferroni test after One-way ANOVA.



A: The expression of the CXCR4 on leukocytes. $n=4$ /group, $P=0.0048$, $F=7.426$, 1) $P<0.05$ vs the control group; 2) $P<0.05$ vs HFD group; 3) $P<0.01$ vs HFD group by Bonferroni test after ANOVA; B: The expression of the CXCR7 on leukocytes. $n=4$ /group, $P=0.0053$, $F=7.238$, 1) $P<0.05$ vs the control group; 2) $P<0.05$ vs HFD group by Bonferroni test after One-way ANOVA.

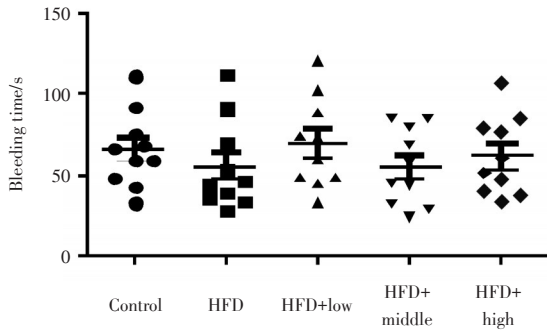
图3 Cy-3-g对 ApoE^{-/-}小鼠白细胞表面 CXCR4、CXCR7 表达水平的影响

Fig.3 The effects of Cy-3-g on the surface expressions of CXCR4 and CXCR7 on leukocytes of ApoE^{-/-} mice

3 讨论

近年来,花色苷因其具抗炎抗氧化、调节血

脂、延缓动脉粥样硬化发生发展的作用而受到了广泛的关注。本课题组在既往花色苷影响血小板功能方面研究的基础上,以血小板趋化因子及其相应受体为切入点,进一步阐明花色苷 Cy-3-g 能



Bleeding time showed no significant difference between all the groups. $n=10/\text{group}$, $F=0.631$, $P=0.643$

图4 Cy-3-g对ApoE^{-/-}小鼠出血时间的影响

Fig.4 The effects of Cy-3-g on bleeding times of ApoE^{-/-} mice

够通过降低动脉粥样硬化小鼠体内血小板趋化因子CXCL12、CCL2以及白细胞表面受体CXCR4、CXCR7的表达,从而起到延缓动脉粥样硬化的效应。

ApoE^{-/-}小鼠可自发形成动脉粥样硬化,为了证实小鼠建模的成功,本研究检测了小鼠的血脂水平和动脉斑块形成情况。与对照组相比,高脂组小鼠血脂明显升高,镜下观察动脉斑块面积增多。而花色苷Cy-3-g对小鼠血脂和动脉斑块形成的改善作用,也与既往相关研究结果符合^[15]。

已有研究表明,MIF、CCL2和CXCL12这三个趋化因子在动脉粥样硬化中高表达,并且通过与白细胞表面相应受体的结合完成炎症细胞趋化募集至内皮损伤处^[6]。MIF通过与CXCR4相互作用使巨噬细胞迁移和募集,从而促进AS的发生发展^[16];AS斑块内大量表达的CXCL12通过与血小板表面受体CXCR4结合,活化血小板,使其发生聚集、释放^[17];而CCL2在急性冠状动脉综合征(ACS)患者血浆的表达显著高于正常对照,是预测ACS患者心血管事件的风险及临床结局的指标^[18]。针对MIF、CCL2和CXCL12这三种血小板趋化因子在动脉粥样硬化形成过程中的关键作用,本研究重点关注了花色苷Cy-3-g对它们及相应受体的影响。结果表明,Cy-3-g不显著影响小鼠血清中MIF的表达水平,但是对CCL2的表达水平有显著的抑制作用。已有研究证实,CCL2是一个可被MIF调控表达的下游分子^[6],该结果提示我们Cy-3-g可能直接抑制AS中的CCL2,而不是抑制

其上游MIF的水平。各剂量的Cy-3-g干预都引起了CXCL12的水平降低,说明Cy-3-g对CXCL12抑制效果要比CCL2更为敏感,这使得CXCL12及其受体可能成为一个强有力的动脉粥样硬化干预靶点。CXCL12和MIF具有相同的受体CXCR4与CXCR7,主要存在于白细胞等炎症细胞表面^[14]。实验结果表明,Cy-3-g能够有效抑制白细胞表面这两种受体的表达,因此Cy-3-g可能通过减少白细胞表面趋化因子受体,来达到抑制血小板与白细胞相互作用的过程。有研究指出,CXCR4与CXCR7的信号通路不完全相同^[16,19]:CXCR4依赖TXA₂信号通路,促进血小板活动和血栓形成,而CXCR7通过Akt途径诱导下游抗细胞凋亡蛋白BAD磷酸化,从而抑制血小板凋亡。因而CXCR4与CXCR7是否存在竞争或者上下游活化的关系,也是我们后期深入探讨和研究的重点。

出血时间是反映机体的凝血功能是否异常的最保守指标,本课题组前期体内研究已证实花色苷高脂膳食喂养的C57小鼠,未表现出明显的出血时间改变^[20]。本实验在此基础上添加了不同剂量Cy-3-g干预的组间比较,结果显示出血时间组间相比未出现明显差异,进一步表明Cy-3-g可在抑制血小板相关病理功能的同时并未造成出血风险,从而为花色苷作为非药物抗动脉粥样硬化的观点提供了强有力的依据。

既往研究发现,花色苷具有降低高脂饲料喂养的ApoE^{-/-}小鼠与大鼠体质量增加的作用^[21],本次研究中,我们观察到相比于单纯高脂饲料喂养的小鼠,Cy-3-g干预的小鼠体质量增长相对缓慢,但最终各组高脂饲料喂养的小鼠体质量增长量没有统计学差异。我们推测造成这种结果可能的原因是所选择的Cy-3-g剂量梯度对体质量变化的抑制作用不敏感,因为既往关于花色苷对体质量影响的动物研究多采用的是1000 mg/kg饲料干预^[20-22],高于本研究的最高剂量组(800 mg/kg)。因此对于花色苷是否具有控制体质量的生理功效,还需更进一步的探讨。

综上所述,本研究证实了在不影响出血时间的情况下,花色苷Cy-3-g能够显著改善ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化和血脂异常,显著降低血小板趋化因子CXCL12、CCL2水平及白细胞表面受体CXCR4、CXCR7的表达,为花色苷防治动脉粥样硬化提供了理论依据。

参考文献

- [1] Ross R. Atherosclerosis-- an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [2] Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease [J]. *Thromb Haemostasis*, 2008, 99(3): 480-486.
- [3] Lievens D, von Hundelshausen P. Platelets in atherosclerosis [J]. *Thromb Haemostasis*, 2011, 106(5): 827-838.
- [4] Karshovska E, Weber C, von Hundelshausen P. Platelet chemokines in health and disease [J]. *Thromb Haemostasis*, 2013, 110(5): 894-902.
- [5] Gleissner CA, von Hundelshausen P, Ley K. Platelet chemokines in vascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(11): 1920-1927.
- [6] Charo IF. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease [J]. *Circ Res*, 2004, 95(9): 858-866.
- [7] van der Vorst EPC, Döring Y, Weber C. Chemokines and their receptors in Atherosclerosis [J]. *J Mol Med*, 2015, 93(9): 963-971.
- [8] Zhu Y, Ling W, Guo H, et al. Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: A randomized controlled trial [J]. *Nutr Metab Cardiovasc*, 2013, 23(9): 843-849.
- [9] Wallace TC. Anthocyanins in cardiovascular disease [J]. *Adv Nutr*, 2011, 2(1): 1-7.
- [10] Yang Y, Shi Z, Rehemani A, et al. Plant food delphinidin-3-glucoside significantly inhibits platelet activation and thrombosis: Novel protective roles against cardiovascular diseases [J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37323.
- [11] Yang Y, Andrews MC, Hu Y, et al. Anthocyanin extract from black rice significantly ameliorates platelet hyperactivity and hypertriglyceridemia in dyslipidemic rats induced by high fat diets [J]. *J Agr Food Chem*, 2011, 59(12): 6759-6764.
- [12] Zhang X, Zhu Y, Song F, et al. Effects of purified anthocyanin supplementation on platelet chemokines in hypocholesterolemic individuals: A randomized controlled trial [J]. *Nutr Metab*, 2016, 13(1): 86-78.
- [13] Song F, Zhu Y, Shi Z, et al. Plant food anthocyanins inhibit platelet granule secretion in hypercholesterolaemia: Involving the signalling pathway of PI3K- Akt [J]. *Thromb Haemostasis*, 2014, 112(5): 981-991.
- [14] Chatterjee M, Rath D, Gawaz M. Role of chemokine receptors CXCR4 and CXCR7 for platelet function [J]. *Biochem Soc T*, 2015, 43(4): 720-726.
- [15] Wang D, Zou T, Yang Y, et al. Cyanidin-3-O-beta-glucoside with the aid of its metabolite protocatechuic acid, reduces monocyte infiltration in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Biochem Pharmacol*, 2011, 82(7): 713-719.
- [16] Wirtz TH, Tillmann S, Strussmann T, et al. Platelet-derived MIF: A novel platelet chemokine with distinct recruitment properties [J]. *Atherosclerosis*, 2015, 239(1): 1-10.
- [17] van der Vorst EP, Döring Y, Weber C. MIF and CXCL12 in cardiovascular diseases: functional differences and similarities [J]. *Front Immunol*, 2015, 11(6): 373-387.
- [18] Gonzalez-Quesada C, Frangogiannis NG. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 as a biomarker in acute coronary syndromes [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2009, 11(2): 131-138.
- [19] Walsh TG, Harper MT, Poole AW. SDF-1 α is a novel autocrine activator of platelets operating through its receptor CXCR4 [J]. *Cell Signal*, 2015, 27(1): 37-46.
- [20] Zhou F, Deng X, Chen Y, et al. Anthocyanin cyanidin-3-glucoside attenuates platelet granule release in mice fed high-fat diets [J]. *J Nutr Sci Vitaminol*, 2017, 63(4): 237-243.
- [21] Farrell N, Norris G, Lee SG, et al. Anthocyanin-rich black elderberry extract improves markers of HDL function and reduces aortic cholesterol in hyperlipidemic mice [J]. *Faseb J*, 2015, 6(4): 1278-1286.
- [22] Jiang X, Guo H, Shen T, et al. Cyanidin-3-O-beta-glucoside purified from black rice protects mice against hepatic fibrosis induced by carbon tetrachloride via inhibiting hepatic stellate cell activation [J]. *J Agr Food Chem*, 2015, 63(27): 6221-6230.

(编辑 刘清海)