

差异化乙醇浓度对小鼠动脉粥样硬化风险的调控

刘宇航 孙静 刘燊宇 何世萱 段雅

长沙医学院 第一临床学院, 湖南长沙, 410219;

摘要: 目的: 明确乙醇浓度及频次对减轻冠状动脉粥样硬化性心脏病的适用范围, 发挥对冠状动脉粥样硬化的保护作用。方法: 建立冠状动脉粥样硬化小鼠模型, 分别每日以 5%、10% 和 15% 乙醇溶液灌胃 1~3 次。用 ELIAS 方法检测甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、白细胞介素 1 α (IL-1 α) 及白细胞介素 1 β (IL-1 β) 的浓度, 分析乙醇对其产生的影响。结果: 与对照组相比, 5% 乙醇一日两次组和 15% 乙醇一日一次组 IL-1 β 的浓度升高 ($P < 0.05$), 5% 乙醇一日三次组和 10% 乙醇一日一次组显著增加 IL-1 β 浓度 ($P < 0.01$); 5% 乙醇一日两次组 IL-1 α 的浓度降低 ($P < 0.05$); 15% 乙醇一日一次组的甘油三酯 (TG) 浓度下降 ($P < 0.05$), 5% 乙醇一日一次组、5% 乙醇一日两次组、5% 乙醇一日三次组和 10% 乙醇一日两次组的甘油三酯 (TG) 浓度显著下降 ($P < 0.01$); 5% 乙醇一日两次组、10% 乙醇一日两次组和 15% 乙醇一日一次组总胆固醇 (TC) 浓度下降 ($P < 0.05$), 5% 乙醇一日一次组、5% 乙醇一日三次组和 10% 乙醇一日一次组总胆固醇 (TC) 浓度显著下降 ($P < 0.01$); 在 5% 乙醇一日一次组中高密度脂蛋白 (HDL) 下降 ($P < 0.05$), 5% 乙醇一日三次组中高密度脂蛋白 (HDL) 显著下降 ($P < 0.01$); 低密度脂蛋白 (LDL) 浓度实验组与对照组未见明显变化 ($P > 0.05$); 10% 乙醇一日三次组、15% 乙醇一日两次组小鼠存活数量低, 不具有代表性, 无法得出可靠的实验数据。15% 乙醇一日三次组小鼠全部死亡, 可能是由于动脉粥样硬化引起的动脉血栓完全阻塞血管引起的小鼠死亡。结论: 低乙醇可降低甘油三酯 (TG) 和总胆固醇 (TC), 可能对冠状动脉粥样硬化性心脏病具有潜在保护作用; 在 5% 乙醇一日一次组和 5% 乙醇一日三次组中高密度脂蛋白 (HDL) 显著下降, 会导致心血管疾病风险上升; IL-1 β 浓度明显升高, 有增加冠心病发病风险的可能性。且乙醇可能会使本就身患动脉粥样硬化疾病的群体, 加剧动脉血栓的发病风险, 所以将乙醇治疗冠状动脉粥样硬化的方法应用于 CHD 患者, 还需要进一步的研究。

关键词: 动脉粥样硬化性心脏病; 心脏病; 乙醇; 甘油三酯

DOI: 10.69979/3029-2808.25.11.018

引言

冠状动脉粥样硬化性心脏病 (coronary atherosclerotic heart disease, CHD), 简称冠心病。近年来, 冠心病的发病率不断增加, 严重威胁着人们的身体健康, 并且成为了全球范围内的高发疾病^[1]。血脂异常是冠状动脉粥样硬化发病机制中的一个关键危险因素^[11], 血液中脂质成分不断堆积于冠状动脉, 发生单核细胞浸润与炎症反应, 造成了动脉粥样硬化^[14], 使心脏供血的冠状动脉产生了粥样硬化斑块。慢慢的斑块逐渐扩大造成了狭窄, 直至冠状动脉的狭窄或者闭塞, 进而引起了冠心病。冠心病的本质就是动脉粥样硬化, 只不过是冠状动脉这个局部动脉粥样硬化形成的比较严重, 就导致冠状动脉粥样硬化性心脏病。

据当前研究现状, CHD 患者不建议饮酒。摄入乙醇

后, 乙醇代谢产物对血管内皮造成损伤, 促进动脉粥样硬化的发生^[9], 加重冠心病, 甚至引起心肌梗死。但部分研究表明, 轻、中度摄入乙醇除了降低心肌梗死的发病率外, 还能提高患者发生心肌梗死后的存活率。可能是适度饮酒对冠状动脉粥样硬化性心脏病具有潜在的保护作用^[2]。NLRP3 炎症小体是脂质代谢和炎症之间的桥梁, 且与动脉粥样硬化斑块不稳定性密切相关^[15]。在 CHD 的发展过程中, 局部巨噬细胞引起炎症反应并分泌细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白介素-1 α (interleukin-1 α , IL-1 α), 而乙醇有效抑制了 NLRP3 和 AIM2 炎性细胞分泌 IL-1 β 和 IL-1 α 的作用, 这些发现可能部分解释了适度饮酒对 CHD 保护作用的机制^[13]。

对冠状动脉粥样硬化治疗的作用, 目前研究甚少。在不明确何为适量浓度及频次的情况下, 治疗冠状动脉

粥样硬化性心脏病并不推荐使用乙醇溶液。本课题将不同低浓度的乙醇溶液分不同频次作用于冠状动脉粥样硬化小鼠,通过对其 IL-1 α 、IL-1 β 等炎症因子的测定,初步探明乙醇溶液不同浓度对冠状动脉粥样硬化的影响,为临床治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病提供新的理论依据和治疗方案。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物模型

ApoE 小鼠, 50 只, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, SPF 级, 7 周龄, 雄性。

1.1.2 仪器和耗材信息

立式冷藏陈列柜 (LSC-316C, 冷链集成股份有限公司, 浙江); 卧式冷冻箱 (BCD-318AT, 长虹美菱股份有限公司, 合肥); 电子天平 (ME203E/02, 梅特勒-托利多公司, 瑞士); 全自动生化分析仪 (Chambray 800, 雷杜生命科技有限公司, 深圳); 高速组织研磨仪 (KZ-III-F, Servicebio 公司, 武汉); 实验室超纯水机 (A K-R0-C2, 济南艾肯环保科技有限公司, 济南); 全自动洗板机 (RT-3100C, 雷杜生命科技有限公司, 深圳); 电热鼓风干燥箱 (GEL-70, Labotery 公司, 天津); 涡旋混合器 (MX-F, Servicebio 公司, 武汉); 酶标检测仪 (Epoch, BioTeK 公司, 美国); 酒精度数测试计购自湖北省武强县华鸥仪器仪表厂; 台式高速冷冻离心机 (D3024R, 大龙兴创实验仪器股份公司, 北京); 1.5ml 离心管购自 servicebio 公司; 5000ul、1000ul、200ul、10ul 移液器 (SPIP-5000/SPIP-1000/SPIP-200/SP-IP-10, Servicebio 公司, 武汉) 45mm 灌胃针, 1ml 普通塑料针筒购自上海玻利鸽工贸有限公司。

1.1.3 试剂盒信息

总胆固醇 (total cholesterol, TC) 测定试剂盒、甘油三酯 (triglyceride, TG) 测定试剂盒、高密度脂蛋白测 (high density lipoprotein, HDL) 定试剂盒、低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL) 测定试剂盒购自深圳雷杜生命科学股份有限公司, Mouse IL-1 β ELISA Kit (小鼠白介素 1 β 酶联免疫 elisa 试剂盒) 购自 Servicebio 公司, Mouse IL-1 α ELISA Kit (小鼠白介素 1 α 酶联免疫 elisa 试剂盒) 购自上海一研生物科技有限公司, 乙醇溶液购自重庆江小白酒业有限公司。

司, 用蒸馏水配置而成 5%乙醇溶液、10%乙醇溶液及 15%乙醇溶液。

1.2 方法

1.2.1 实验动物建模与分组

选取健康 ApoE 雄性小鼠 50 只, 高脂饲料 D12108C (协同生物) 喂养 12 周后, 建立动脉粥样硬化小鼠模型, 选取体重为 25~30g 的小鼠进行下一步实验。

随机选取一组为实验对照组 (A), 将实验组小鼠随机分为 9 组, 即 5%乙醇溶液一日一次 (B 组)、5%乙醇溶液一日两次 (C 组)、5%乙醇溶液一日三次 (D 组)、10%乙醇溶液一日一次 (E 组)、10%乙醇溶液一日两次 (F 组)、10%乙醇溶液一日三次 (G 组)、15%乙醇溶液一日一次 (H 组)、15%乙醇溶液一日两次 (I 组)、15%乙醇溶液一日三次 (J 组), 每组五只。

1.2.2 灌胃

建模成功后, 各组均喂食普通饲料, 实验对照组模拟灌胃生理盐水, 各实验组分别灌胃不同阶梯浓度的乙醇溶液, 灌胃剂量 0.001ml/g, 灌胃过程中均严格遵守操作规范和注意事项, 以确保灌胃的安全和有效性。

1.2.3 血脂四项、IL-1 α 及 IL-1 β 浓度的测定

ApoE 小鼠经眼眶采血后, 使用台式高速冷冻离心机, 常温下 3000r/min 离心 15min, 取上清液, 进行预前处理后, 放入全自动生化分析仪中进行检测, 测得总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL) 及低密度脂蛋白 (LDL) 的含量。IL-1 α 及 IL-1 β 浓度的测定均按照 Mouse IL-1 α ELISA Kit 及 Mouse IL-1 β ELISA Kit 说明书进行操作。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 软件 27.0.1 进行统计分析, 实验结果的数据均表达为均数 \pm 标准差。各组数据的显著性采用独立样本 t 检验分析, 以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 乙醇对 ApoE 小鼠动脉粥样硬化的影响

小鼠灌胃 15 天后, 取静脉血进行检测。检测结果显示, 一定浓度的乙醇对血脂四项及 IL-1 α 、IL-1 β 的升高或降低有显著的影响, 对加重或减轻动脉粥样硬化有重要意义。

检测结果显示, 各实验组与空白对照组相比, 如表

1 所示, 5%乙醇一日两次组和 15%乙醇一日一次组 IL-1 β 的浓度升高 ($P<0.05$), 5%乙醇一日三次组和 10%乙醇一日一次组显著增加 IL-1 β 浓度 ($P<0.01$), 见图 1; 5%乙醇一日两次组 IL-1 α 的浓度降低 ($P<0.05$), 见图 2。

表 1 乙醇对 ApoE 小鼠白细胞介素 1 α 、1 β ($\mu\text{g/L}$) 的影响

	IL-1 β	IL-1 α
对照组	16.65 \pm 4.78	141.10 \pm 13.32
5%一日一次组	24.54 \pm 7.75	132.43 \pm 2.99
5%一日两次组	27.48 \pm 6.58 *	120.84 \pm 5.17 *
5%一日三次组	37.82 \pm 5.52 **	136.07 \pm 7.21
10%一日一次组	43.96 \pm 3.35 **	129.97 \pm 10.37
10%一日两次组	17.31 \pm 7.41	146.77 \pm 2.48
15%一日一次组	33.28 \pm 11.93 *	131.94 \pm 8.86

*: $p<0.05$ **: $p<0.01$

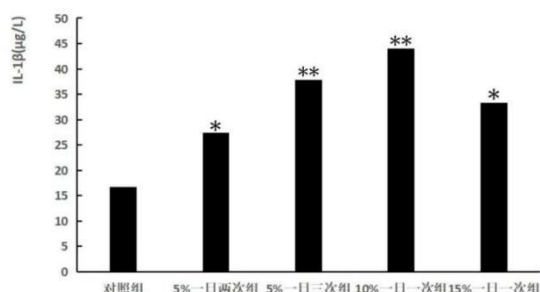


图 1 乙醇促进巨噬细胞分泌 IL-1 β

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

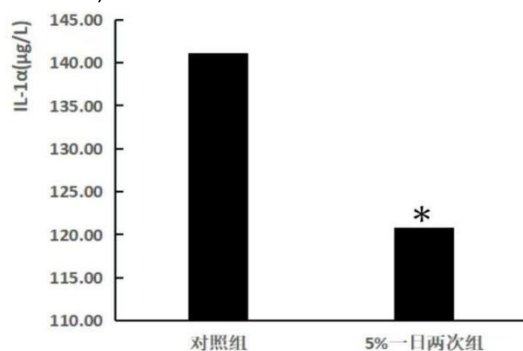


图 2 乙醇抑制巨噬细胞分泌 IL-1 α

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

如表 2 所示, 乙醇对 ApoE 小鼠血脂水平有不同程度的影响。15%乙醇一日一次组的 ApoE 小鼠的甘油三酯 (TG) 浓度下降 ($P<0.05$), 5%乙醇一日一次组、5%乙醇一日两次组、5%乙醇一日三次组和 10%乙醇一日两次组的甘油三酯 (TG) 浓度显著下降 ($P<0.01$), 见图 3; 5%乙醇一日两次组、10%乙醇一日两次组和 15%乙醇一日一次组总胆固醇 (TC) 浓度下降 ($P<0.05$), 5%乙醇一日一次组、5%乙醇一日三次组和 10%乙醇一日一次组总胆固醇 (TC) 浓度显著下降 ($P<0.01$) 见图 4;

5%乙醇一日一次组中高密度脂蛋白 (HDL) 下降 ($P<0.05$), 5%乙醇一日三次组中高密度脂蛋白 (HDL) 显著下降 ($P<0.01$), 见图 5; 低密度脂蛋白 (LDL) 浓度实验组与对照组未见明显变化 ($P>0.05$)。其中, 10%乙醇一日三次组、15%乙醇一日两次组小鼠存活数量低, 不具有代表性, 无法得出可靠的实验数据, 15%一日三次组小鼠在实验中全部死亡。

表 2 乙醇对 ApoE 小鼠血脂水平 (mmol/L) 的影响

	TG	TC	HDL	LDL
对照组	2.84 \pm 0.23	17.71 \pm 1.04	1.47 \pm 0.21	4.50 \pm 2.07
5%一日一次组	1.60 \pm 0.13 **	11.25 \pm 1.07 **	1.10 \pm 0.03 *	4.86 \pm 0.10
5%一日两次组	1.28 \pm 0.24 **	14.38 \pm 1.23 *	1.73 \pm 0.14	5.39 \pm 0.72
5%一日三次组	0.93 \pm 0.21 **	9.65 \pm 1.19 **	0.93 \pm 0.12 **	2.37 \pm 0.98
10%一日一次组	2.95 \pm 0.75	13.57 \pm 1.67 **	1.31 \pm 0.08	6.74 \pm 0.66
10%一日两次组	1.05 \pm 0.32 **	15.35 \pm 1.07 *	1.68 \pm 0.47	5.30 \pm 0.35
15%一日一次组	1.75 \pm 0.61 *	13.38 \pm 2.76 *	1.46 \pm 0.32	5.09 \pm 0.43

*: $p<0.05$ **: $p<0.01$

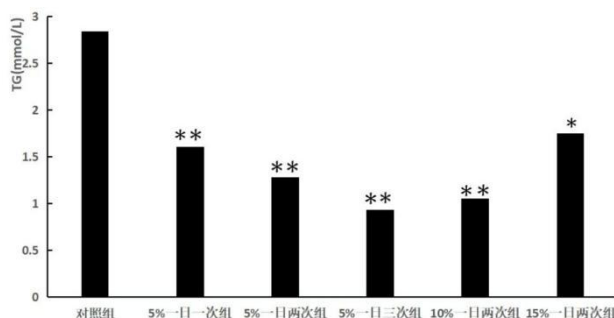


图 3 乙醇显著降低 TG 浓度

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

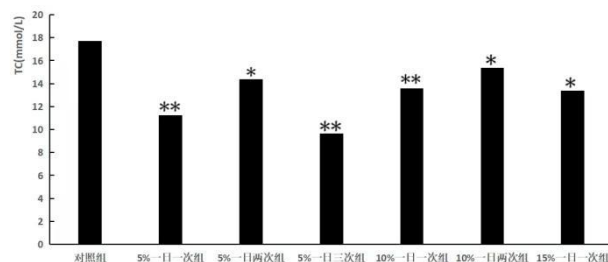


图 4 乙醇显著降低 TC 浓度

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

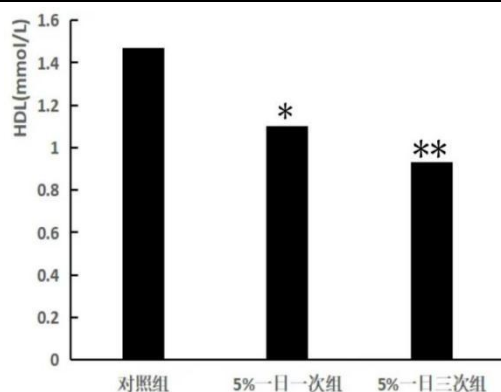


图 5 乙醇显著降低 HDL 的浓度

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 乙醇对动脉粥样硬化小鼠动脉血栓的影响

此次实验小鼠为纯合 Apoe 敲除小鼠, 先天缺乏 AP OE 蛋白, 小鼠生长发育正常, 但显示总血浆胆固醇水平显著增加和自发性动脉粥样硬化病变^[12]。小鼠死亡前可观察到胸部一突起, 质硬, 出现此症状后 48h 左右小鼠死亡, 解剖后可见突起部位颜色呈黄色, 考虑动脉血栓。查阅大量文献发现, 小鼠出现此类现象的原因可能是由于动脉粥样硬化引起的动脉血栓(但不排除血栓栓塞的可能性), 最终导致血管狭窄或完全阻塞, 造成小鼠死亡。

3 讨论

根据流行病学显示, 乙醇一直被认为是心血管疾病的致病因素之一^[10], 但不同低浓度乙醇分频次作用于动脉粥样硬化小鼠可达到预期治疗效果。本文实验结果显示给予小鼠灌胃 5%乙醇浓度一日一次组, 5%乙醇浓度一日两次组, 5%乙醇一日三次组, 10%乙醇一日两次组和 15%乙醇一日两次组可显著降低 TG 的浓度; 5%乙醇一日一次组、5%乙醇一日两次组、5%乙醇一日三次组、10%乙醇一日一次组、10%乙醇一日两次组和 15%乙醇一日一次组 TC 含量明显下降, 说明不同频次灌胃低浓度乙醇对小鼠动脉粥样硬化具有一定的治疗作用。而 5%乙醇一日一次组和 5%乙醇一日三次组中 HDL 含量显著下降, 因 HDL 在体内具有抗动脉粥样硬化的作用, HDL 浓度下降, 心血管疾病的风险也显著上升。

有研究显示, 低浓度乙醇可通过抑制 NLRP3 炎症小体的活化而减少巨噬细胞产生 IL-1 α 和 IL-1 β ^[4], 起到降低冠状动脉粥样硬化性心脏病发病风险的作用。但本文实验结果显示, 5%乙醇一日三次组、5%乙醇一日两次组、10%乙醇一日一次组和 15%乙醇一日一次组 IL-1 β

显著增加 IL-1 β 浓度, 与预期实验结果相悖; 5%乙醇一日两次组 IL-1 α 的浓度明显降低, 而同组的 IL-1 β 浓度明显升高, 综合其他组别判断, 低浓度的乙醇可能会增加冠心病的发病风险。

10%乙醇一日三次组、15%乙醇一日两次组小鼠死亡率 40%, 15%乙醇一日三次组小鼠全部死亡, 其腹部和胸部连接处可见一突出体表的硬块, 解剖可见其内为黄色, 可能是此剂量及频次加重了小鼠主动脉粥样硬化斑块的形成, 造成小鼠死亡。

乙醇是一把双刃剑, 低浓度、低频次可能降低动脉粥样硬化发病风险, 但过量则会导致细胞坏死、炎症因子分泌增多^[5], 促进冠状动脉粥样硬化的形成, 造成不可估量的后果^[6]。且乙醇同样也是其他疾病的诱发因素, 如胃炎、肝硬化、心律失常等, 所以不能确保在低浓度乙醇治疗动脉粥样硬化的同时不会对其他器官造成损害, 且在治疗过程中个体差异难以确定^[4], 所以将乙醇治疗冠状动脉粥样硬化的方法应用于 CHD 患者, 还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] QAMAR A, RADER DJ. Effect of interleukin 1 β inhibition in cardiovascular disease[J]. Curr Opin Lipidol, 2012, 23(6): 548-553.
- [2] SZABO G, LIPPAI D. Converging actions of alcohol on liver and brain immune signaling [J]. Int Rev Neurobiol, 2014, 118(3): 359-380.
- [3] CUI K, YAN G, XU C, et al. Invariant NKT cells promote alcohol-induced steatohepatitis through interleukin-1 β in mice[J]. J Hepatol, 2015, 62(6): 1311-1318.
- [4] 周婧, 姜迎萍, 赵一俏. 乙醇通过抑制 NLRP3 炎症小体减轻冠状动脉粥样硬化[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(19): 3164-3167.
- [5] YUUI K, KUDO R, KASUDA S, et al. The inhibitory effect of ethanol on interleukin-1 β -induced suppression of contractile response in the rat superior mesenteric Artery [J]. Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi, 2015, 50(3): 158-166.
- [6] 王一钦, 姜宏宇, 赵娣, 等. 微量元素水平与颈动脉粥样硬化相关性分析[J]. 中风与神经疾病杂志, 2022,

39(9):818-822. DOI:10.19845/j.cnki.zfysjjbzz.2022.0203.

[7] MASSARO M, SCODITTI E, CARLUCCIO MA, et al. Alcohol and atherosclerosis: a double edged sword [J]. *Vascul Pharma-col*, 2012, 57(2-4):65-68.

[8] Niyonzima N, Bakke S S, Gregersen I, et al. Cholesterol crystals use complement to increase NLRP3 signaling pathways in coronary and carotid atherosclerosis [J]. *EBioMedicine*, 2020, 60:102985

[9] 刘瑶, 潘亚慕, 付坚, 等. NLRP3 炎症小体在动脉粥样硬化中的作用机制及相关治疗策略 [J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2022, 51(3):425-429. DOI:10.3870/j.issn.1672-741.2022.03.022.

[10] COSTANZO S, DI CASTELNUOVOA, DONATI MB, et al. Alcohol consumption and mortality in patients with cardiovascular disease: a meta-analysis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(13):1339-1347.

[11] 纪凌云, 吴俏兰, 陈泽涛, 等. 基于 NLRP3 炎症小体介导的巨噬细胞焦亡探究黄芩-黄连对动脉粥样硬化的干预机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(7):121-130. DOI:10.13422/j.cnki.syfjx.20240202.

[12] 高锦. 放射工作人员循环系统疾病辐射流行病学调查及辐射诱发动脉粥样硬化的研究 [D]. 江苏: 苏州大学, 2022.

[13] 李友乾, 张金国, 宋秉春. 轻中度饮酒对心血管疾病风险和益处的研究进展 [J]. *中国临床实用医学*, 2019, 10(5):67-69. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-8799.2019.05.020.

[14] 张馨予, 谢子月, 王梓安, 等. 动脉粥样硬化中抗内皮细胞功能障碍的治疗进展 [J/OL]. *中国动脉硬化杂志*, 1-11 [2025-1-5]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1262.R.20241205.1414.006.html>.

[15] 孟庆雯, 刘华江, 易泓汝, 等. NLRP3 炎症小体在动脉粥样硬化中的作用机制和靶向炎症治疗的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(01):79-86. DOI:10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.01.011.

作者简介: 刘宇航 (2002.09.19-), 女, 新疆维吾尔自治区塔城地区塔城市人, 汉族, 本科, 学生, 长沙医学院, 研究方向: 心血管疾病。

课题项目: 长沙医学院 2023 年校级大学生创新创业训练计划项目“乙醇浓度及频次对冠状动脉粥样硬化的影响”(项目编号: 长医教[2023]51 号-131)。