

通阳宽胸颗粒对冠状动脉硬化大鼠血脂及 IL-17A, VCAM-1 和 ICAM-1 表达的影响

袁丁, 靳利利, 黄培红, 苏慧, 王清海
(广东省第二中医院, 广州 510095)

[摘要] **目的:**通过观察通阳宽胸颗粒对动脉硬化大鼠的冠脉微循环障碍改善作用,探讨中西医结合治疗心血管疾病的疗效。**方法:**Wistar 大鼠 50 只,随机分为通阳宽胸颗粒组($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),辛伐他汀组($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),通阳宽胸颗粒 + 辛伐他汀组,模型组和正常组,除正常组外,制备动脉硬化大鼠模型,正常组常规饲养,模型组和治疗组大鼠给予高脂饮食和维生素 D_3 *ip*,喂饲 4 周后,灌胃给药 8 周,处死后取血清酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白(LDL-C),分析动脉斑块面积,另取主动脉行免疫组化及蛋白质免疫印迹(Western blot),观察白细胞介素-17A(IL-17A),血管间细胞黏附分子(VCAM-1)和白细胞间黏附分子(ICAM-1)的表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠血清动脉斑块面积,TC, TG, LDL-C 明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组血清 TC, TG, LDL-C 明显下降,动脉斑块面积明显缩小($P < 0.05$, $P < 0.01$),与单独使用通阳宽胸颗粒治疗相比,中西医结合治疗组改善更明显($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组冠状动脉粥样硬化组织 IL-17A, VCAM-1 和 ICAM-1 的表达显著下降($P < 0.01$),且中西医结合治疗效果优于单独使用中药。**结论:**通阳宽胸颗粒可通过改善血脂指标,降低动脉斑块面积,降低 IL-17A, VCAM-1 和 ICAM-1 的表达,缓解组织炎症,治疗冠状动脉粥样硬化性疾病,中西医结合治疗值得临床进一步推广。

[关键词] 通阳宽胸颗粒; 冠状动脉粥样硬化; 白细胞介素-17A; 血管间细胞黏附分子-1; 白细胞间黏附分子-1
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)14-0163-04
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016140163

Effect of Tongyang Kuanxiong Granule on Blood Lipid and IL-17A, VCAM-1 and ICAM-1 Expression Levels in Coronary Atherosclerosis Rats

YUAN Ding, JIN Li-li, HUANG Pei-hong, SU Hui, WANG Qing-hai
(Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou 510095, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Tongyang Kuanxiong granule on coronary microcirculation improvement in the rat with coronary arteriosclerosis, and to explore the efficacy of the combined treatment of traditional Chinese and Western medicine for cardiovascular diseases. **Method:** Totally 50 Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, Tongyang Kuanxiong granule group ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Simvastatin group ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and the mix treatment group (TY + simvastin). All the rats except those in normal group were used to prepare arteriosclerosis models. The rats in normal group were given with normal diet, and the rats in model group and treatment groups were given with high-fat diet and Vitamin D_3 by *ip*. After 4 weeks of such feeding, the rats were treated for 8 weeks by intragastric administration. The expression levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein (LDL-C) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Artery plaque area was analyzed. Aorta was taken for immunohistochemistry and Western blot to detect the expression levels of interleukin (IL)-17A, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM)-1 and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM)-1. **Result:** As compared with the normal group, the serum artery plaque area, expression levels of TC, TG, LDL-C were significantly increased in rats of model group ($P < 0.05$). As compared with the model group, the expression levels of TC, TG, LDL-C levels, and artery

plaque area were significantly reduced in treatment groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with Tongyang Kuanxiong granule group, the improvement effect was more obvious in mixed treatment group ($P < 0.05$). As compared with model group, the expression levels IL-17A, VCAM-1 and ICAM-1 in coronary atherosclerosis tissues were decreased in treatment groups ($P < 0.05$), and the efficacy of mixed treatment group was better than that of Tongyang Kuanxiong granule alone group. **Conclusion:** Tongyang Kuanxiong granules can relieve tissue inflammation and treat coronary atherosclerotic diseases by improving blood lipid indexes, reducing the expression levels of IL-17A, VCAM-1, ICAM-1, and reducing artery plaque area, so the integrated Chinese and western medicine treatment is worthy for further promotion.

[**Key words**] Tongyang Kuanxiong granules; coronary atherosclerosis; interleukin-17A; vascular cell adhesion molecule-1; intercellular adhesion molecule-1

冠心病是当代威胁人类中老年健康的常见疾病之一,是造成中老年死亡的首要原因,其发病率正在呈逐年上升的趋势^[1]。中医理论认为,冠心病心肌缺血是冠状动脉粥样硬化导致的冠脉狭窄或闭塞,主要病机为阳微阴弦,“阳微”主要是指阳气不通;“阴弦”是指阳气不通不能运行气血津液导致的心脉痹阻,既往多数研究也多集中在活血化瘀等方面,如薛忠文等人通过建立冠状动脉大鼠模型发现,参芍口服液能够通过调节脂质代谢,降低白细胞介素-8(IL-8),血管间细胞黏附分子-1(VCAM-1)和白细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达,同时抑制平滑肌细胞迁移和动脉粥样硬化斑块的形成^[2]。也有研究采用通阳化痰法发现通阳中药葱白提取物可以有效改善心肌缺血和抗氧化损伤,具有良好的抗心肌缺血作用和抗动脉粥样硬化作用^[3-5]。通阳宽胸颗粒为本院王清海教授经验方剂,本课题组以往的临床及实验研究表明:通阳宽胸颗粒可以有效改善心肌缺血、对于治疗缺血再灌注损伤疗效良好,具有良好的抗心肌缺血作用^[6]。但其对心血管系统的保护机制尚不明确,尤其对动脉粥样硬化的疗效和机制仍未知。为求进一步探索通阳宽胸法防治冠心病微循环障碍的有效性和作用机制,本研究拟建立冠状动脉硬化大鼠模型,通过观察通阳宽胸颗粒对动脉硬化大鼠血管斑块、血脂及炎症因子影响,为中西医结合防治冠心病提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 20 周龄的清洁级 Wistar 大鼠 120 只雌雄各半,中山大学实验动物中心,体重 180 ~ 220 g,合格证号。

1.2 药物及试剂 通阳宽胸颗粒(桂枝 30 g,薤白 30 g,枳实 20 g,陈皮 10 g,延胡索 30 g,香附 15 g,瓜蒌皮 15 g,炙甘草 10 g,郁金 10 g),广东省中医药工程技术研究院提供;辛伐他汀片(杭州默沙东制药

有限公司,批号 H10970385),丙基硫氧嘧啶(南通精华制药有限公司生产,批号 060403);维生素 D₃(VD₃)针剂,总胆固醇(TC)试剂盒,甘油三酯(TG)试剂盒,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒及 IL-17A 兔抗鼠多克隆一抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 06100712-1015p,12-1107p,12-0813p);ICAM-1 兔抗鼠多克隆一抗(北京博奥森生物技术有限公司,批号 bs-1378R),VCAM-1 兔抗鼠多克隆一抗(武汉博士德生物技术有限公司,批号 BA0406)。

1.3 仪器 BG-sub MIDI 型电泳仪(美国 Baygene 公司)。

2 方法

2.1 动物建模及分组 雄性 Wistar 大鼠 50 只,随机分为 5 组,给药组(通阳宽胸颗粒组、通阳宽胸颗粒 + 辛伐他汀组、辛伐他汀组)、模型组和正常组,每组 10 只。正常组常规饲养,其余组给喂食高脂高糖饲料(3% 胆固醇,0.5% 胆酸钠,0.2% 丙基硫氧嘧啶,5% 白糖,10% 猪油,81.3% 基础饲料),并 ip VD₃360 万 U·kg⁻¹,以复制动脉粥样硬化大鼠模型^[7]。最终成功造模 46 只。

2.2 动脉粥样硬化模型建立的确认^[8] AS 建立的标准为苏木素-伊红(HE)染色显示主动脉血管内皮连续性中断,管壁局部向管腔突出形成斑块:内膜下钙化;中膜平滑肌增生、排列紊乱、弹力纤维断裂、钙化;外膜变薄。

2.3 给药方式及剂量 换算方法公式参考《中药药理研究方法学》人、大鼠剂量转换公式^[9],大鼠饲养 4 周后 ig 给药,通阳宽胸颗粒组剂量为 50 mg·kg⁻¹,配成质量分数为 0.81% 的药液,每天 ig 给药 1 次,体积为 10 mL·kg⁻¹,辛伐他汀组按 5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 给药,通阳 + 辛伐组以通阳宽胸颗粒药液联合辛伐他汀 ig,每天 1 次,均连续 8 周给药。同时正常组

和模型组给予等量生理盐水 *ig* 8 周。

2.4 标本取材方法 大鼠灌药 8 周后,末次给药前禁食 12 h。给药 1 h 后,用 20% 乌拉坦 0.5 mL/100 g 体重麻醉,从腹主动脉取血,酶联免疫吸附测定 (ELISA) 法测定血清血脂;取完整主动脉(从主动脉根部至髂总动脉分叉处),一部分置 4% 多聚甲醛中固定,行免疫组化和 HE 染色;另一部分放入冻存管保存在 -80 °C 冰箱中,用于免疫印迹检测,观察 IL-17A, ICAM-1, VCAM-1 的表达。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计进行分析,AS 模型大鼠斑块面积采用 Ipp 5.0 图像分析软件测量,统计学处理定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验其显著性;组间分析采用 ANOVA 分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 AS 模型大鼠斑块面积、斑块管腔面积比值的影响 模型组斑块面积显著增大;与模型组比较,辛伐他汀组斑块面积减小 ($P < 0.01$),通阳宽心颗粒组与模型组相比较,斑块面积有显著减小 ($P < 0.01$);与单独使用通阳宽胸颗粒比较,中西药结合

组斑块面积改变有统计学意义 ($P < 0.05$);其他给药组组间比较无明显统计学差异。见表 1。

表 1 通阳宽胸颗粒对 AS 模型大鼠斑块面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Tongyang Kuanxiong granules on patch area in AS model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	斑块面积/μm
正常	-	10	18.07 ± 7.64
模型	-	9	48.44 ± 7.18 ²⁾
通阳宽胸颗粒	50	10	36.07 ± 7.18 ⁴⁾
辛伐他汀	5	9	21.46 ± 4.70 ⁴⁾
通阳 + 辛伐	50 + 5	8	21.05 ± 4.23 ^{4,5)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与单独使用通阳宽胸颗粒比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 2,3 同)。

3.2 对 AS 模型大鼠 TC, TG, LDL-C 的影响 模型组 TC, TG, LDL-C 明显高于正常组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,给予通阳宽胸颗粒和辛伐他汀治疗后,TC, TG, LDL-C 表达明显下调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),与单独使用通阳宽胸颗粒比较,中西医结合治疗对 TC, TG, LDL-C 的影响差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 通阳宽胸颗粒对 AS 模型大鼠 TC, TG, LDL-C 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Tongyang Kuanxiong granules on TC, TG, LDL-C in AS model rats ($\bar{x} \pm s$) mol·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	TC	TG	LDL-C
正常	-	10	1.10 ± 0.17	0.67 ± 0.08	0.68 ± 0.11
模型	-	9	17.15 ± 5.10 ¹⁾	0.87 ± 0.14 ¹⁾	10.33 ± 0.99 ²⁾
通阳宽胸颗粒	50	10	13.03 ± 3.41 ³⁾	0.66 ± 0.07 ³⁾	7.14 ± 0.81 ⁴⁾
辛伐他汀	5	9	10.88 ± 1.84 ³⁾	0.43 ± 0.09 ³⁾	6.70 ± 0.45 ⁴⁾
通阳 + 辛伐	50 + 5	8	5.23 ± 1.50 ^{4,5)}	0.49 ± 0.10 ^{4,5)}	6.85 ± 0.45 ^{4,5)}

3.3 对 AS 模型大鼠主动脉 IL-17A, ICAM-1, VCAM-1 蛋白表达的影响 正常组无 IL-17A, ICAM-1 蛋白的表达;与正常组比较,模型组血管内膜 IL-17A, ICAM-1, VCAM-1 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,经通阳宽胸颗粒及辛伐他汀治疗后,VCAM-1, ICAM-1 蛋白表达较模型组下降 ($P < 0.01$);与单独使用通阳宽胸颗粒组比较,通阳 + 辛伐组下降更为明显差别具有统计学意义 ($P <$

0.05)。见表 3, 图 1。

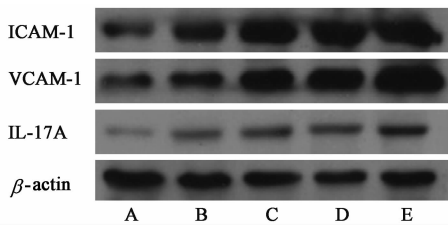
4 讨论

冠心病的发病基础为 AS, 而 AS 是一种多因素参与的病理过程, 其发病机制与血管内皮损伤、脂质的氧化与浸润、炎症细胞渗透、免疫性细胞因子的表达等多个病理环节有关。上述机制在导致粥样斑块侵蚀和崩解的过程中起了关键作用, 而针对这些病理环节进行靶向治疗有望成为防治 AS 的有效手段之一。

表 3 通阳宽胸颗粒 AS 模型大鼠主动脉 IL-17A, ICAM-1, VCAM-1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of Tongyang Kuanxiong granules on IL-17A, ICAM-1, VCAM-1 protein expression of aortic in AS model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	n	IL-17A	ICAM-1	VCAM-1
正常	-	10	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型	-	9	3.15 ± 1.06 ¹⁾	3.45 ± 0.37 ¹⁾	2.87 ± 0.58 ¹⁾
通阳宽胸颗粒	50	10	2.87 ± 0.97	2.38 ± 0.58 ⁴⁾	2.45 ± 0.74 ⁴⁾
辛伐他汀	5	9	2.04 ± 0.46 ⁴⁾	1.99 ± 0.40 ⁴⁾	1.72 ± 0.52 ⁴⁾
通阳 + 辛伐	50 + 5	8	1.64 ± 0.40 ^{4,5)}	1.71 ± 0.45 ^{4,5)}	1.46 ± 0.52 ^{4,5)}



A. 正常组; B. 通阳 + 辛伐组; C. 通阳宽胸颗粒组; D. 辛伐他汀组; E. 模型组

图 1 通阳宽胸颗粒 AS 模型大鼠主动脉 IL-17A, ICAM-1, VCAM-1 蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of Tongyang Kuanxiong granules on IL-17A, ICAM-1, VCAM-1 protein expression of aortic in AS model rats

脂代谢异常是 AS 发病的重要危险因素,检测胆固醇和甘油三酯能够反映 AS 的病变水平。经给药治疗后显著降低了大鼠的 TC, TG 和 LDL-C 的水平,尤以中西医结合组为甚,提示通阳宽胸颗粒具有调脂作用,可以下调 TC, TG 和 LDL-C 的水平。

现代研究认为, AS 是一种慢性炎症状态,既往研究表明,细胞间黏附分子参与诱导炎症反应及血栓形成,促进了冠状动脉粥样硬化性心脏病的发生、发展^[10]。而 IL-17A 也是免疫系统研究领域的热点之一,与多种慢性炎症性疾病关系密切,但在 AS 系统中研究颇少^[11-13]。并且其在 AS 形成、发展中所起到的调控作用的研究尚存在争议。既往这些研究均使用间接的方法来评估 IL-17 在 AS 形成过程中的作用。因此本研究观察通阳宽胸颗粒对大鼠动脉粥样硬化模型中相关炎症因子,包括细胞黏附因子和炎症介质 IL-17A 表达的影响,观察其对大鼠粥样硬化形成中炎症反应的调节作用。笔者的实验收集标本的直接采集病变部位血管,从而更加直观的观察病变血管的相关炎症细胞因子的变化,能够更好的研究 IL-17A 介导的免疫炎症反应以及细胞黏附因子在 AS 中的调节作用。本研究发现炎症介质参与了动脉粥样硬化斑块的形成,而予通阳宽胸颗粒治疗能够显著抑制该变化提示能够通过炎症介质的抑制发挥抗大鼠动脉粥样硬化形成的作用,尤其联合西药治疗比单独使用效果更佳。另外免疫组织化学染色法显示 IL-17A 主要表达于动脉粥样硬化的动脉壁内膜病变处,而在正常组未见表达。说明 IL-17A 与动脉粥样硬化的发生发展关系密切,这与薛忠文^[2]等人的研究一致。

中医认为冠脉微循环障碍,应属心络受损、血瘀阻络。心气虚乏是形成心络病变的重要因素,气虚运血无力,或气滞血行不利,使气血津液输布障碍,引起脏腑功能失调瘀阻络脉。络脉细急常在络脉瘀

阻的基础上发生,也可单独为患,络脉细急又可加重络脉瘀阻,二者可互为因果。结合中医“治病求本”的治疗原则,故通阳宽胸颗粒中用桂枝温阳通脉,为君药,薤白通阳散结,行气止痛,瓜蒌祛痰散结开胸,共为臣药,三药相配,一温阳通脉,二除痰结、通气机,相辅相成,枳实破气消积;化痰除痞,元胡、郁金、香附等活血行气止痛,炙甘草温中,调和诸药,共为佐使药,诸药共奏通阳化浊之功,本方更侧重于温通心脉之治本之法。笔者运用通阳化浊法防治冠状动脉硬化的治疗方法将为冠心病的治疗拓展思路,为冠心病的中西医防治提供更为充足的依据。

[参考文献]

[1] 甘受益,鲁应佳. 冠状动脉支架植入后再狭窄应对策略[J]. 咸宁学院学报:医学版,2010,24(3):624-625.

[2] 薛忠文,董天崑. 参芍口服液对冠状动脉粥样硬化大鼠主动脉 IL-8, VCAM-1 和 ICAM-1 表达的影响[J]. 中成药,2014,34(11):2077-2081.

[3] 张介眉,张耕,郝建军,等. 葱白提取物纳米乳对急性心肌缺血兔血清 NO 和 TnT 水平的影响[J]. 中西医结合研究,2011,2(3):17-20.

[4] 张介眉,时昭红,郝建军,等. 华夏小葱制剂对动脉粥样硬化兔心率变异影响的实验研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2007,13(9):675-678.

[5] 段刚峰,郝建军,朱旭,等. 葱白提取物对急性心肌梗死大鼠心肌梗死标志物的影响[J]. 中华临床医师杂志 2012,4(6):1840-1841.

[6] 袁丁,金小咪,苏慧,等. 通阳宽胸颗粒对急性心肌梗死缺血再灌注大鼠心肌损伤的影响[J]. 云南中医中药杂志,2014,35(9):71-74.

[7] 卢维晟,姚俊宇,方根强,等. 不同方法建立动脉粥样硬化大鼠模型的比较[J]. 心脏杂志,2005,17(1):18-20.

[8] 胡琴,张运. 基因工程小鼠动脉粥样硬化模型的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2006(8):725-727.

[9] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:1103.

[10] Raman K, Chong M, Akhtar-Danesh G G, et al. Genetic markers of inflammation and their role in cardiovascular disease[J]. Can J Cardiol, 2013,29(1):67-74.

[11] Agache I C, Ciobanu, C, Agache C, et al. Increased serum IL-17 is an independent risk factor for severe asthma[J]. Respir Med, 2010,104(8):1131-1137.

[12] Lafdil F, Miller A M, Ki S H, et al. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases[J]. Cell Mol Immunol, 2010,7(4):250-254.

[13] Sarra M, Pallone F, Macdonald T T, et al. IL-23/IL-17 axis in IBD [J]. Inflamm Bowel Dis, 2010,16(10):1808-1813.

[责任编辑 周冰冰]