

大黄蛭虫丸对动脉粥样硬化鼠 NF- κ B 通路及炎症因子影响

司秋菊¹, 张艳慧¹, 王鑫国¹, 江玉娟², 王贵娟¹

(1. 河北医科大学, 石家庄 050091; 2. 沧州市中心医院感染科, 河北沧州 061001)

[摘要] 目的: 观察大黄蛭虫丸(DHZCP)对动脉粥样硬化(AS)大鼠炎症相关因子表达的影响, 探讨 DHZCP 抗 AS 免疫炎症的机制。方法: SD 雄性大鼠 32 只随机分为对照组、模型组、DHZCP 高剂量、低剂量(1.4, 0.7 g·kg⁻¹)组, 每组 8 只。采用高脂饲料联合维生素 D₃ (VitD₃) 复制大鼠 AS 模型, 21 d 后, 用 DHZCP 灌胃 8 周, 观察各组大鼠甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)及血清肿瘤坏死因子(TNF- α), HE 染色观察主动脉病理变化, 免疫组织化学染色观察核因子- κ B(NF- κ B)及细胞间黏附分子(ICAM-1)蛋白表达, 并采用半定量计算机图像分析计算 NF- κ B 及 ICAM-1 阳性细胞率。结果: 模型组血脂、血清 TNF- α 升高; 主动脉内膜显著增厚, 可见纤维帽和胆固醇结晶; NF- κ B 及 ICAM-1 蛋白表达阳性细胞率分别是(47.35 \pm 5.18)%, (55.92 \pm 0.40)%, 明显高于 DHZCP 治疗组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。DHZCP 2 个剂量组血清脂质、TNF- α 明显低于模型组; DHZCP 高剂量组主动脉病变较较低剂量组轻, 明显优于模型组; NF- κ B 及 ICAM-1 蛋白表达阳性细胞率(16.71 \pm 4.43)%, (19.73 \pm 0.28)%, 明显低于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论: DHZCP 通过下调 NF- κ B 信号通路的蛋白表达, 减少 TNF- α , ICAM-1 等炎症因子释放, 抑制炎症反应, 发挥抗 AS 作用。

[关键词] 动脉粥样硬化; 核因子- κ B; 大黄蛭虫丸; 肿瘤坏死因子; 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(2013)07-0254-05

[doi] 10.11653/zgsyfyjxzz2013070254

Effects of Dahuang Zhechong Pill on the Expression of NF- κ B Pathway and Inflammatory Factors in Atherosclerosis Rats

SI Qiu-ju¹, ZHANG Yan-hui¹, WANG Xing-guo¹, JIANG Yu-juan², WANG Gui-juan¹

(1. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China;

2. Cangzhou Central Hospital, Cangzhou 061001, China)

[Abstract] **Objective:** This experiment is mainly to estimate the expression nuclear factor-kappa B and

[收稿日期] 20120723(013)

[基金项目] 河北省教育厅项目(20042011); 河北省中医管理局项目(05163)

[第一作者] 司秋菊, 教授, 从事中西医结合心脑血管疾病临床、教学和科研工作, Tel: 0311-86265393, E-mail: siqiuju@163.com

[3] 蒋薇, 杨键, 裴志胜, 等. 中药制剂促毛发生作用观察[J]. 中国临床康复, 2005, 9(30): 158.

[4] 余建强, 闫琳, 郑萍, 等. 实验动物脱毛剂的改良与应用[J]. 宁夏医学院学报, 2001, 23(4): 296.

[5] 张榕文, 王玉华, 赵冉, 等. 中药育发液提高皮肤微循环的药效学研究[J]. 中国医药导报, 2011, 8(8): 55.

[6] 仇锦春, 廖清船, 张永, 等. 香丹注射液对急性血瘀模型大鼠血液流变性及血小板聚集的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 137.

[7] 蒋海峰, 宿树兰, 欧阳臻, 等. 乳香、没药提取物及其配伍对血小板聚集与抗凝血酶活性的影响[J]. 中国

实验方剂学杂志, 2011, 17(19): 160.

[8] 赵荣乐. 一种测定凝血酶抑制活性的新方法[J]. 喀什师范学院学报, 2003, 24(6): 52.

[9] 薛芬, 赵章光, 赵胜霞, 等. 章光 101 生发系列产品对 C57BL/6J 小鼠触须毛囊体外培养的研究[J]. 延安大学学报: 医学科学版, 2009, 7(3): 7.

[10] 赵章光. 章光牌 101 毛发再生精治疗脂溢性脱发 328 例的观察报告[J]. 中医杂志, 1988, 29(9): 51.

[11] 李卫江. 银杏叶萃取物的生发效果和改善毛细血管血液循环效果[J]. 日用化学工业译丛, 1994(4): 36.

[责任编辑 李玉洁]

inflammatory factors related in atherosclerosis (AS) model rats and investigate the anti-AS mechanism of Dahuang Zhechong Pill (DHZCP). **Method:** SD rats were divided into control group, model group, high and low dose DHZCP treated group ($1.4, 0.7 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). There are average eight rats every group. AS model was made by high fat feeding and injected vitamin D₃. After 21 days, low and high dose DHZCP treated group were given low and high dose DHZCP respectively except control group and model group. Rats were fed totally for 8 weeks, the level of serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), highdensity lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), tumor necrosis factor (TNF- α), pathological change of aortic tissue were observed. Immunohistochemical technique was utilized to measure the expression of nuclear factor κ B (NF- κ B) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). Positive cells rate of NF- κ B and ICAM-1 made by half quantitative computer image analysis. **Result:** Compared with control group, the level of TC, TG, LDL-C, TNF- α in model group were higher and HDL-C was lower remarkably. HE staining revealed the aortic intima was obviously thickened. Cholesterol crystal and fibrous cap were seen in the aortic intima plaque. Immunohistochemical detection showed NF- κ B and ICAM-1 protein were found in the intima plaque and plasma membrane of foam cells in model group, While the positive-cells rate of NF- κ B and ICAM-1 expression were respectively (47.35 ± 5.18)% and (55.92 ± 0.40)% increased than treatment group ($P < 0.01, P < 0.05$). Compared with model group, the level of TC, TG, LDL-C, TNF- α in two treatment group were lower and HDL-C was higher remarkably ($P < 0.01, P < 0.05$). Pathological change in high dose DHZCP group is most remarkably decreased than others, While in low dose DHZCP is better than model group. The positive-cells rate of NF- κ B and ICAM-1 expression were respectively (16.71 ± 4.43)% and (19.73 ± 0.28)% reduced than model group ($P < 0.01, P < 0.05$). **Conclusion:** DHZCP could have the effect of anti-AS by cut down expression of canonical NF- κ B signaling pathway, and inhibition inflammatory factors of TNF- α , ICAM-1.

[**Key words**] atherosclerosis; nuclear factor-kappa B; Dahuang Zhechong Pill; tumor necrosis factor; intercellular adhesion molecule-1

目前,动脉粥样硬化(AS)发病机制有多种学说,其中炎症学说(inflammatory hypothesis)是AS发生机制的重要学说。核因子- κ B(NF- κ B)作为AS的炎症标志物之一^[1],参与了炎症过程中多种信号转导,在炎症反应网络中处于中心地位^[2],研究其生物学特性并通过药理学作用进行调控,对于防治细胞炎症反应的发生发展具有重要的临床意义。大黄蛭虫丸(DHZCP)是张仲景活血化瘀名方,具有疏通经络、破瘀生新、缓中补虚之功效。我们以往研究证实^[3],DHZCP具有抗AS作用,为了进一步明确作用机制,本实验围绕AS-炎症观察了DHZCP对于动脉粥样硬化大鼠NF- κ B信号通路以及相关炎症因子的影响。

1 材料

1.1 动物 SD雄性大鼠32只,体重(180~200)g,由河北省实验动物中心提供。动物许可证号SCXK(冀)2008-1-003。

1.2 药物及试剂 DHZCP购自徐州颐海药业有限公司,批号060402。实验前将药物分别研成粉剂按剂量比配制制成2个质量浓度混悬液(0.7,1.4 g·

kg⁻¹)以备使用。¹²⁵I肿瘤坏死因子(TNF- α)放射免疫分析试剂盒,北京普尔伟业生物科技有限公司,批号071101。一抗NF- κ B p65,编号sc372,北京中山生物技术有限公司;细胞间黏附分子-1(ICAM-1),编号BA0541,武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器 Histocentres型包埋机、Citadel2000型脱水机、AS-325切片机(英国姗顿公司),YT-6B型烤片机(湖北孝亚光电子技术研究所),TMY-781B型微波仪(浙江临安电子仪器厂)。BHS型光学显微镜(日本Olympus),FJ-2021 γ 型放射免疫计数器(国营262厂)。HMIAS-2000型高清晰度彩色医学图文分析系统(湖北千屏影像公司)。

2 方法

2.1 AS模型建立^[4] 高脂饲喂联合维生素D₃(VitD₃)复制大鼠AS模型。高脂饲料配方:1%胆固醇,0.35%胆酸,5%炼制猪油,0.1%丙硫氧嘧啶及基础饲料。VitD₃按70万U·kg⁻¹的总剂量分3d腹腔注射,连续观察21d。

2.2 分组及给药 SD雄性大鼠常规观察1周,随机分4组,每组8只,正常对照组、模型组、DHZCP

组。除正常对照组外的各组均饲喂高脂饲料,并腹腔注射 VitD₃;正常对照组给与基础饲料饲喂,并腹腔注射与 VitD₃ 等体积的生理盐水。21 d 后正常对照组、模型组:每天灌胃蒸馏水 0.1 mL·kg⁻¹, DHZCP 高、低剂量组分别灌胃 DHZCP 混悬液 1.4, 0.7 g·kg⁻¹,继续观察 8 周。

2.3 检验指标

2.3.1 生化指标的检测 实验结束后大鼠断头取血,低温离心,3000 r·min⁻¹,15 min 分离血清,采用酶法测定甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。

2.3.2 平衡饱和放射免疫分析法测定 TNF-α 取静脉血 2 mL,4 ℃ 3 000 r·min⁻¹离心 10 min,分离血清。采用平衡法,测定各管沉淀放射性计数率(cpm)。

2.3.3 主动脉血管病理形态 取大鼠主动脉,剥离外膜附着组织,置于 10% 福尔马林固定,石蜡切片,常规 HE 染色形态学观察及免疫组织化学染色。

2.3.4 免疫组化法检测 NF-κB p65, ICAM-1 蛋白表达 石蜡切片 5 μm,常规脱蜡至水,3% 过氧化氢甲醇液室温浸泡 10 ~ 15 min,消除内源性过氧化物酶活性。抗原修复 2 min,用 1% BSA 封闭,室温 10 ~ 15 min,倾去血清。滴加一抗(兔抗鼠多克隆,效价 1:50),置于湿盒中 4 ℃ 冰箱过夜,0.01 mol·L⁻¹ PBS 振洗 5 min 共 3 次。滴加二抗 pv 6001/pv 6002 葡聚糖-过氧化物酶复合物,37 ℃ 孵育 60 min,0.01 mol·L⁻¹ PBS 振洗 5 min 共 3 次。DAB 显色 5 min,蒸馏水洗 5 次。苏木素复染 1 min,脱水、透明、

中性树胶封片。光镜下观察结果,NF-κB p65 胞核染色呈棕黄色表示阳性。ICAM-1 阳性反应表现为胞浆呈现棕黄色颗粒。

2.3.5 NF-κB p65, ICAM-1 蛋白表达半定量计算机图像分析 每组随机选取 5 例免疫组化切片,置显微镜下观察,每张切片选择阳性目标最多的区域,采取 4 个视野,由摄像系统提取细胞图像,输入 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统,计算阳性细胞百分率。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血脂的影响 模型组血清 TG, TC, LDL-C 含量比对照组明显升高($P < 0.01, P < 0.05$),血清 HDL-C 明显降低($P < 0.01$);DHZCP 低剂量组与模型组对比 TG, LDL-C 明显降低,有显著性差异($P < 0.05$);DHZCP 高剂量组与模型组对比 TG, TC, LDL-C 明显降低($P < 0.01, P < 0.05$),HDL-C 含量明显升高,有显著性差异($P < 0.01$),这表明 DHZCP 高、低剂量均有降血脂的作用,随着药物剂量增加疗效增强,且降甘油三酯作用优于降胆固醇作用。结果见表 1。

3.2 对 TNF-α 的影响 模型组较对照组血清中的 TNF-α 显著增高($P < 0.05$),DHZCP 低剂量组、高剂量组与模型组相比血清中 TNF-α 显著降低($P < 0.05$),DHZCP 不同剂量血清 TNF-α 水平无明显差别。结果见表 1。

表 1 DHZCP 对大鼠血脂及 TNF-α 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

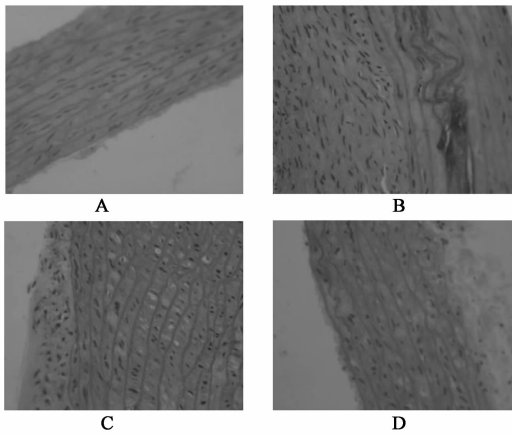
组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹	TC /mmol·L ⁻¹	HDL-C /mmol·L ⁻¹	LDL-C /mmol·L ⁻¹	TNF-α /pg·mL ⁻¹
正常对照	-	0.85 ± 0.34 ¹⁾	2.12 ± 0.18 ²⁾	1.47 ± 0.28 ¹⁾	0.36 ± 0.19 ²⁾	1.86 ± 0.28 ¹⁾
模型	-	1.27 ± 0.34	2.81 ± 0.36	1.04 ± 0.28	0.73 ± 0.08	2.72 ± 0.40
DHZCP	0.7	0.92 ± 0.18 ¹⁾	2.58 ± 0.23	1.14 ± 1.02	0.52 ± 0.31 ¹⁾	1.81 ± 0.13 ¹⁾
	1.4	0.78 ± 0.17 ²⁾	2.35 ± 0.27 ¹⁾	2.90 ± 1.97 ²⁾	0.41 ± 0.18 ²⁾	1.79 ± 0.34 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$ 。

3.3 主动脉病理形态 模型组主动脉壁内膜显著增厚向管腔突起,病灶表面由纤维细胞、胶原纤维构成纤维帽,其下方有脂质、少许炎细胞,有大量粉红色的无结构物质即玻璃样变,其中可见胆固醇结晶及钙化形成。DHZCP 低剂量组主动脉内膜稍有增厚,病灶可见表层纤维帽较薄,其下为大量泡沫细胞。DHZCP 高剂量组主动脉内膜无明显增

厚,平滑肌细胞排列较规整,但可见轻度水肿。见图 1。

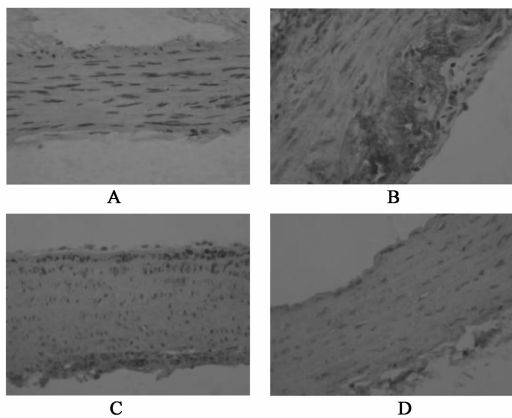
3.4 对主动脉血管 NF-κB 蛋白表达的影响 正常对照组未见棕黄色颗粒(-)。模型组病变早期血管内皮细胞、平滑肌细胞蛋白表达主要分布于细胞核(++),胞浆内亦可见少量分布;病变晚期结构破坏阳性表达减弱仅在细胞核内表达。DHZCP 低剂量



A. 正常对照组, B. 模型组,
C. DHZCP 0.7 g·kg⁻¹组, D. DHZCP 1.4 g·kg⁻¹组

图1 DHZCP对主动脉血管病理变化的影响(HE染色, ×200)

组血管内皮细胞、平滑肌细胞及泡沫细胞胞浆内蛋白表达,胞核内亦可见少量分布(+),但较模型组早期变化明显减弱。DHZCP高剂量组:血管内皮细胞、平滑肌细胞胞浆内见少量表达,胞核内表达微弱(±)。模型组阳性细胞率(47.35 ± 5.18)%,显著高于对照组(3.58 ± 2.46)%,有统计学意义(P < 0.01),阳性细胞数在脂纹期最多,纤维斑块期有逐渐减少的趋势。DHZCP高、低剂量组NF-κB阳性表达分别是(16.71 ± 4.43)%, (29.96 ± 2.23)%,显著低于模型组(P < 0.01),表明DHZCP高、低剂量均可抑制血管壁NF-κB蛋白表达,阳性细胞率见表2,蛋白表达量见图2。



A. 正常对照组; B. 模型组;
C. DHZCP 0.7 g·kg⁻¹组; D. DHZCP 1.4 g·kg⁻¹组

图2 DHZCP对主动脉血管NF-κB蛋白表达的影响(免疫组织化学染色, ×200)

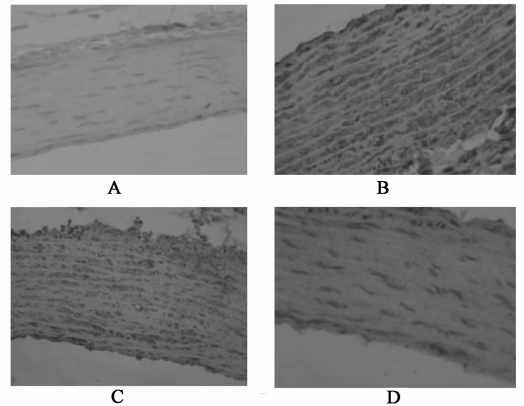
3.5 对主动脉血管 ICAM-1 蛋白表达的影响 正常对照组未见棕黄色颗粒(-)。模型组病变血管内皮细胞、平滑肌细胞有多量棕黄色颗粒,呈强阳性表

表2 DHZCP对大鼠主动脉组织 ICAM-1, NF-κB 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ICAM-1 阳性细胞率	NF-κB 阳性细胞率
正常对照	-	13.36 ± 0.37 ²⁾	3.58 ± 2.46 ²⁾
模型	-	55.92 ± 0.40	47.35 ± 5.18
DHZCP	0.7	29.80 ± 0.59 ¹⁾	29.96 ± 2.23 ¹⁾
	1.4	19.73 ± 0.28 ¹⁾	16.71 ± 4.43 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

达(++)。DHZCP低剂量组血管内皮细胞散在棕黄色颗粒,呈阳性表达(+),较模型组明显减弱。DHZCP高剂量组血管内皮细胞呈弱阳性表达(±)。模型组ICAM-1的阳性细胞率(55.92 ± 0.40)%,与正常对照组相比显著增加(P < 0.01); DHZCP高、低剂量组ICAM-1的阳性细胞率分别是(19.73 ± 0.28)%和(29.80 ± 0.59)%,比模型组显著降低(P < 0.05)。表明DHZCP高、低剂量均可抑制血管壁ICAM-1蛋白表达量,且随着剂量增加作用有增强趋势。阳性细胞率见表2,蛋白表达量见图3。



A. 正常对照组, B. 模型组,
C. DHZCP 0.7 g·kg⁻¹组, D. DHZCP 1.4 g·kg⁻¹组

图3 DHZCP对主动脉血管 ICAM-1 蛋白表达的影响(免疫组织化学染色, ×200)

4 讨论

AS是1种慢性炎症反应, NF-κB参与炎症、免疫、氧化应激反应的全过程,是重要的核转录因子。研究证实^[5],当受到多种因素的刺激后,通过经典途径或非经典途径使NF-κB活化,启动靶基因的转录,激发一系列级联式炎症反应,刺激下游相关基因表达,故NF-κB位于炎症反应的轴心,是促AS发生的共同通路。同时大量研究结果显示,许多与炎症相关的疾病通过调控NF-κB信号通路,减轻炎症反应,收到满意的效果^[6-7]。NF-κB也被认为是1种很有前途的治疗靶点,抑制其活性,可降低心血管事件

的风险,因此,倍受研究者的关注。

由于血管内皮细胞受损,在炎症刺激因子等因素影响下,NF- κ B 活化,继之使 ICAM-1 表达增强^[8]。ICAM-1 基因启动子上含有 NF- κ B 结合位点^[9],NF- κ B 的 p50 亚基的核定位序列与 ICAM-1 的 κ B 位点发生特异性结合,NF- κ B 含有转录激活区的 p65 亚基能启动 ICAM-1 的转录,介导白细胞和血管内皮细胞的黏附作用,激发炎症反应,加速 AS 的演进。

本实验模型组血脂升高,病理显示纤维帽及玻璃样变性,其中可见胆固醇结晶及钙化形成,提示 AS 模型成功。模型组血清中 TNF- α 显著升高,由于这个前炎性因子的刺激使得主动脉血管 NF- κ Bp65 阳性细胞数在脂纹期明显增多,纤维斑块期有减少的趋势。NF- κ B 蛋白表达明显增强,从而启动基因的转录,促进了 ICAM-1 的表达增多,从而使一系列的炎性因子释放,介导了免疫炎症反应的发生,这与文献报道一致^[11]。

采用 DHZCP 进行干预,其低剂量组、高剂量组血清中的 TNF- α 显著于低模型组,表明 DHZCP 通过抑制炎性因子释放,防止了内皮细胞的损伤。DHZCP 治疗后 p65 蛋白胞核表达微弱,仅在胞浆有表达,推测可能与 I κ B 激酶失活,阻止了游离的 NF- κ B 进入细胞核有关。显示 NF- κ B 处于静息状态,未被活化,终止了一系列级联式反应,减少了内皮细胞对 ICAM-1 蛋白表达量,阻抑了血液中的脂质过氧化物与内皮细胞相互黏附及内皮细胞迁移。

本研究提示 DHZCP 通过经典途径下调 NF- κ B 蛋白表达,抑制了 NF- κ B 信号通路的活化及一系列炎性因子的释放,有效的防止动脉粥样硬化早期病变形成。但 DHZCP 是如何通过阻抑 I κ B 的磷酸化和泛素化,从而阻止 NF- κ B 进入细胞核这一关键步

骤,有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Zhang W, Xing S S, Sun X L. Overexpression of activated nuclear factor- κ B in aorta of patients with coronary [J]. *Atheroscler Clin Cardiol*, 2009, 32(12): 42.
- [2] 戴翠莲. 泛素-蛋白酶体系统与动脉粥样硬化性疾病的发生 [J]. *国际心血管病杂志*, 2006, 33(3): 169.
- [3] 贾运乔, 司秋菊, 刘朝霞, 等. 大黄蛰虫丸对动脉粥样硬化作用的研究 [J]. *河北中医药学报*, 2009, 24(4): 7.
- [4] 温进坤, 韩梅, 杜玮南, 等. 一种快速建立大鼠动脉粥样硬化模型的实验方法 [J]. *中国老年学杂志*, 2001, 21(1): 50.
- [5] Madonna, R., De Caterina, R. Relevance of new drug discovery to reduce NF- κ B activation in cardiovascular disease [J]. *Vascul Pharmacol*, 2012, 57(1): 41.
- [6] 刘政, 张钥, 郝清智, 等. 消栓通脉颗粒对深静脉血栓形成大鼠静脉壁 NF- κ B, I κ B 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(20): 210.
- [7] 任守忠, 郭建生, 李鑫, 等. 安胃丸对慢性胃炎大鼠血清炎性因子及胃黏膜核因子- κ B 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(4): 198.
- [8] 李强翔, 钟惠菊, 周敏, 等. 葛根素对糖尿病大鼠血脂和主动脉细胞间黏附分子-1 表达的调控 [J]. *中国行为医学科学*, 2006, 15(11): 981.
- [9] 于运福. 动脉粥样硬化中的核转录因子 NF- κ B [J]. *实用诊断与治疗杂志*, 2006, 20(4): 277.
- [10] 梁萍, 孙雷, 唐建武, 等. 细胞间黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 和肿瘤坏死因子 α 在人动脉粥样硬化病灶中的表达及意义 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, 12(4): 427.

[责任编辑 李玉洁]