

川芎嗪抗家兔动脉粥样硬化作用

王国峰¹, 陆峰², 赵霞¹, 陈冬梅^{3*}

(1. 济南军区总医院, 济南 250031; 2. 山东中医药大学附属医院, 济南 250011;
3. 中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

[摘要] **目的:**研究川芎嗪抗动脉粥样硬化(AS)的药效学及作用机制。**方法:**随机将 24 只新西兰家兔分为 4 组,即正常饮食组、模型对照组、川芎嗪(75 mg·kg⁻¹)组及川芎嗪(150 mg·kg⁻¹)组。采用高脂饲料建立 AS 模型,12 周后评价川芎嗪对主动脉斑块面积、内膜/中膜厚度比值、内膜泡沫细胞数、HE 染色后主动脉形态学及血脂水平的影响。**结果:**川芎嗪(75, 150 mg·kg⁻¹)与模型对照组比较,其斑块面积分别为(420.4 ± 46.2) mm², (310.2 ± 12.3) mm², (663.2 ± 38.9) mm², $P < 0.01$; 内膜/中膜厚度比值(0.32 ± 0.06), (0.24 ± 0.15), (1.21 ± 0.10) ($P < 0.01$); 降低内膜泡沫细胞数分别为(9.8 ± 5.1) 个/mm², (5.3 ± 1.2) 个/mm², (23.6 ± 6.7) 个/mm² ($P < 0.01$)。HE 染色后的光镜下,川芎嗪可减轻主动脉内膜增厚程度,降低泡沫细胞聚集,保持中膜和平滑肌结构基本完整,减少内皮细胞脱落,改善动脉紊乱的形态结构;川芎嗪还可降低血脂水平而维持内皮细胞正常的生理功能。**结论:**川芎嗪靶向内皮细胞干预 AS 早期始动环节,抑制泡沫细胞形成产生抗 AS 作用。

[关键词] 血管内皮细胞; 动脉粥样硬化; 川芎嗪

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0202-04

Effect of Ligustrazine on Atherosclerosis in Rabbits

WANG Guo-feng¹, LU Feng², ZHAO Xia¹, CHEN Dong-mei^{3*}

(1. The General Hospital of Jinan Military Area Command of PLA, Ji'nan 250031, China;
2. The Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Ji'nan 250031, China;
3. Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the antiatherosclerotic efficacy by ligustrazine (LIG). **Method:** Twenty-four rabbits were randomly divided into four groups: normal control group, model control group, LIG (75 mg·kg⁻¹) group and LIG (150 mg·kg⁻¹) group. In *in vivo* experiments, rabbits fed by high cholesterol diet have been used to evaluate the antiatherosclerotic efficacy of LIG (75, 150 mg·kg⁻¹) including plaque surface area in aorta, intima/media (I/M) ratios, foam cell amounts, serum lipid level of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) after twelve weeks. **Result:** Compared with model control group, LIG could reduce the plaque surface area in aorta at the dose of 75, 150 mg·kg⁻¹ (420.4 ± 46.2) mm² and (310.2 ± 12.3) mm² vs (663.2 ± 38.9) mm², $P < 0.01$. I/M ratios and foam cell amounts were also decreased ($P < 0.01$). Serum lipid level of TC, TG and LDL-C was depressed; however serum level of HDL-C had no changes. **Conclusion:** Antiatherosclerotic effects by LIG lie at endothelial cells.

[Key words] endothelial cells; atherosclerosis; ligustrazine

[收稿日期] 20120305(001)

[第一作者] 王国峰, 硕士, 从事老年心脑血管疾病基础与临床, E-mail: gfw3123@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 陈冬梅, 博士, 副研究员, E-mail: chendm@sun5.ibp.ac.cn

大量天然药物对动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)具有防治作用, 临床研究也证实其作用明确、安全性好, 但作用靶标往往不明确, 极大程度限制了临床适应症的推广。川芎嗪对心脑血管系统作用主要为抗心肌缺血再灌注损伤, 抑制钙跨膜内流; 扩张冠状血管, 增加冠脉流量; 抗血栓等^[1-3]。近年有少数

报道川芎嗪通过保护冠脉内皮,减轻缺血及再灌注损伤等^[4],但对于其抗 AS 作用机制涉及较少。本文从内皮损伤诱导泡沫细胞形成这一始动环节入手,建立高脂诱导的 AS 整体模型,研究川芎嗪抗 AS 的药效学,为拓展川芎嗪的临床应用,深化理解其抗 AS 的作用机制奠定理论和实验基础。

1 材料

1.1 动物 健康雄性新西兰家兔,普通级,体质量 2.0~2.5 kg,由军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号为 BDW95014。

1.2 药品与试剂 盐酸川芎嗪:中国药品与生物制品检定所。兔基础饲料:粗蛋白(21.1%)、粗纤维(10.3%)、粗灰分(7.4%)、水分(9%)、钙(1.3%)、磷(0.73%);兔高胆固醇饲料:饲料配方是基础饲料:蛋黄粉:猪油:胆固醇:淀粉=83:10:3:1:3(军事医学科学院实验动物中心)。总胆固醇(TC)和甘油三酯(TG)测定试剂盒:美国 Clonital 公司;低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒:首都医科大学临床医学科技中心;其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 仪器 全自动生化仪(美国 Monarch plus 公司),低温高速离心机(德国 Kendro 公司),石蜡包埋机、密封式组织脱水机(英国 SHANDON Histocentrez),多功能真彩色病理图像分析系统(CMIAS)(北京航空航天大学)。

2 方法

2.1 高脂饮食诱导兔动脉粥样硬化模型的建立 分笼饲养,12 h 光照/黑暗,温度(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,湿度 50%~60%,通风,自由饮水,定点定量给食。动物自由摄食进水 2 周,情况稳定后,随机分 4 组,每组 6 只。①正常饮食组:基础饲料;②模型对照组:高胆固醇饲料;③川芎嗪($75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组:高胆固醇饲料+川芎嗪 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$;④川芎嗪($150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组:高胆固醇饲料+川芎嗪 $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。每日每兔定量给予饲料 120 g。正常饮食组给予基础饲料;高脂饮食组每天给予高胆固醇饲料 $40 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$ 和基础饲料 $80 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$;药物治疗组在给予高胆固醇饲料同时给予川芎嗪喂养;每日下午给予高胆固醇饲料,待兔吃光后再给予基础饲料,各组自由饮水,连续饲养 12 周。

2.2 血清样本处理 于第 12 周末,禁食 12 h 后耳缘静脉取血, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取血清,采用全自动生化分析仪测定 TC, TG, LDL-C, HDL-C 的水平。

2.3 动脉大体标本的综合脂质染色 ①实验 12 周末,空气栓塞法处死兔,迅速取自主动脉弓至髂总动脉分叉处的主动脉,清除主动脉外膜脂肪及肋间动脉、腰动脉等分支处的残根,沿主动脉前壁正中剖开,生理盐水漂洗去除表面血污,平铺于硬纸板上,置 15% 中性福尔马林溶液中固定;②取于 15% 的中性福尔马林溶液中固定 48 h 的主动脉,流水冲洗 24 h,过 70% 乙醇后,置于苏丹 III 染液中浸染 30 min,70% 乙醇分化 2 min,再于苏丹 IV 染液中浸染 30 min,70% 乙醇分化 30 min,流水冲洗 30 min,置于 10% 福尔马林溶液中保存。

2.4 HE 染色与光镜观察 在每条主动脉首对肋间动脉开口上 0.5 cm 及末对肋间动脉开口下 1 cm 处分段取材,每段长 0.5 cm,15% 中性甲醛固定,1 周后经冲洗、脱水、透明后石蜡包埋,行连续切片,厚度 $5 \mu\text{m}$,HE 染色,光镜下观察内膜、中膜的病理变化并拍照。

2.5 主动脉斑块面积及内膜/中膜厚度测量 数码相机对综合脂质染色的兔主动脉逐一采样,由多功能真彩色病理图像分析系统(CMIAS)计算斑块面积。对每张 HE 染色的主动脉横截面切片进行测试,每张切片均取内膜最厚处,从内膜腔面游离缘至内弹力板垂直测量,为内膜厚度;从内弹力板至外弹力板垂直测量,为中膜厚度,求得内膜/中膜厚度比值;动脉内膜单位面积内泡沫细胞数(内膜泡沫细胞密度):在 40×10 倍放大条件下,用目镜测微尺及手控计数器分别计算 5 个小格内的泡沫细胞数,取该动物全部切片的平均值,算出每 1 mm^2 内的泡沫细胞数,即为该动脉内膜单位面积内的泡沫细胞数。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计学软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,多组间的两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对兔主动脉斑块面积、内膜厚度/中膜厚度和内膜泡沫细胞数的影响 肉眼观察正常饮食组兔的主动脉内膜表面光滑、平整,呈乳白色,未见斑块,嗜苏丹染色阴性;在高血脂诱导兔动脉粥样硬化形成模型上主动脉内膜表面粗糙,表面局部出现高起于内膜表面大小不一的乳白色粥样斑块,并相互融合成片,几乎覆盖整条动脉壁,嗜苏丹染色阳性,尤以主动脉弓和胸主动脉及腹主动脉的各动脉分支入口处明显;给予川芎嗪 $75, 150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗后,主动脉内膜较光滑,主动脉弓处斑块融合成片,但厚度明

显较模型组斑块薄,其它部位状脂质沉积散在。川芎嗪可显著降低 AS 状态下斑块面积、内膜/中膜厚度比及内膜泡沫细胞数($P < 0.01$)。见表 1。

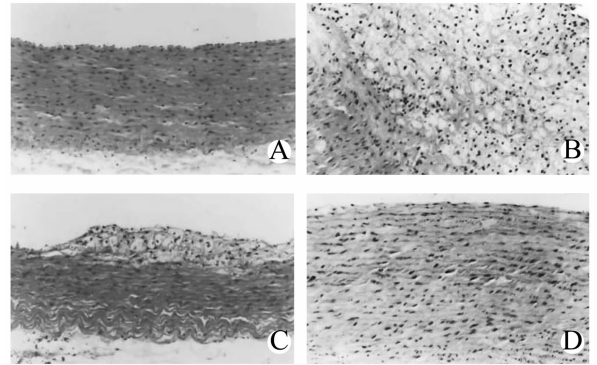
表 1 川芎嗪连续给药 12 周对兔主动脉斑块面积、内膜厚度/中膜厚度和内膜泡沫细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	斑块面积 /mm ²	内膜厚度 /中膜厚度	内膜泡沫 细胞数 个/mm ²
正常饮食	-	0	0.03 ± 0.08	0.20 ± 0.01
模型对照	-	663.2 ± 38.9 ¹⁾	1.21 ± 0.10 ¹⁾	23.6 ± 6.7 ¹⁾
川芎嗪	75	420.4 ± 46.2 ²⁾	0.32 ± 0.06 ²⁾	9.8 ± 5.1 ²⁾
	150	310.2 ± 12.3 ²⁾	0.24 ± 0.15 ²⁾	5.3 ± 1.2 ²⁾

注:与正常饮食组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型对照组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 各组对 HE 染色光镜下兔主动脉形态结构的影响 HE 染色的光镜下,正常饮食组主动脉内弹力膜完整,内皮紧贴内弹力膜排列整齐,中层弹力膜与平滑肌相间平行排列;模型对照组主动脉内膜显著增厚,大量泡沫细胞聚集,内皮细胞或脱落或松散附着于内膜表面,内膜广泛胶原纤维玻璃样病变,弹力纤维破裂消失;川芎嗪 75 mg·kg⁻¹组主动脉内膜增厚程度较模型组减轻,内皮下间隙增大,可见泡沫细胞聚集,但其数目明显少于模型组,中膜结构基本

完整;川芎嗪 150 mg·kg⁻¹组主动脉内膜无增厚,内皮细胞紧贴内弹力膜无脱落。中膜弹力纤维排列整齐,平滑肌细胞极向一致。见图 1。



A. 正常饮食组;B. 模型对照组;
C. 川芎嗪 75 mg·kg⁻¹组;D. 川芎嗪 150 mg·kg⁻¹组

图 1 川芎嗪连续给药 12 周对兔主动脉形态结构的影响(HE 染色, × 200)

3.3 对兔血脂水平的影响 实验结束(12 周末)时,模型对照组血清血脂同正常饮食组比较,TC、TG 和 LDL-C 水平均显著升高($P < 0.01$);川芎嗪低、高剂量组可显著降低 TC、TG、LDL-C 水平($P < 0.01$)。本研究剂量的川芎嗪对血清 HDL-C 的水平无显著影响。见表 2。

表 2 川芎嗪连续给药 12 周对兔血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常饮食	-	1.67 ± 0.86	0.62 ± 0.11	0.61 ± 0.02	0.82 ± 0.13
模型对照	-	27.1 ± 2.08 ¹⁾	5.96 ± 0.68 ¹⁾	20.3 ± 2.34 ¹⁾	0.70 ± 0.21
川芎嗪	75	16.3 ± 1.17 ²⁾	1.37 ± 0.33 ²⁾	10.23 ± 0.19 ²⁾	0.73 ± 0.32
	150	9.23 ± 0.22 ²⁾	1.14 ± 0.53 ²⁾	5.29 ± 0.41 ²⁾	0.89 ± 0.28

4 讨论

目前较公认的“损伤反应学说”认为 AS 是慢性炎症性疾病,内皮细胞活化为其始动环节^[5-7]。正常血管内皮细胞可合成分泌多种活性物质,抑制与 AS 密切相关的血管平滑肌收缩、血小板聚集、平滑肌细胞增生、白细胞黏附和血栓形成,具有抗 AS 作用^[8]。AS 早期,在明显的形态学和血管功能发现显著改变前,内皮细胞功能首先发生紊乱,乙酰胆碱诱导的内皮依赖性血管舒张反应降低,ox-LDL 进入内皮下,损伤内皮细胞诱导趋化因子、黏附分子和炎症因子的表达^[9];以单核细胞为主的白细胞在黏附分子的作用下沿血管壁滚动,黏附于内皮细胞,内皮及内皮下组织受到损伤,单核细胞进入内皮下间隙并

获吞噬脂质形成泡沫细胞,这是脂质斑纹形成前的早期病理改变^[10]。因此在该环节纠正紊乱的内皮细胞功能,抑制泡沫细胞形成,即可在 AS 早期控制其病理性进展。

本研究采用高血脂诱发家兔实验性 AS 模型,评价了天然药物川芎嗪抗高血脂诱发家兔 AS 作用。研究表明,川芎嗪可降低高血脂诱导的兔主动脉斑块面积、降低内膜/中膜厚度比及内膜泡沫细胞数目;HE 染色后的光镜下,川芎嗪可使主动脉内膜增厚程度明显减轻,内皮下间隙减小,降低泡沫细胞聚集的数目,保持中膜结构的基本完整和平滑肌细胞极向的一致性,内皮细胞脱落明显减少。因此川芎嗪可改善主动脉紊乱的内皮细胞形态结构;另外

软肝宁抗四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化

闫冰, 周晓辉, 潘士勇, 王曙东*
(南京军区南京总医院, 南京 210002)

[摘要] 目的: 探讨软肝宁对四氯化碳(CCl_4)诱导的实验性肝纤维化大鼠纤维化水平的影响。方法: 将 60 只大鼠随机分为 6 组: 正常对照组, 给予生理盐水。模型组, 给予 20% 四氯化碳花生油溶液按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ sc}$, 首剂加倍, 注射 1 次/5 d, 首次注射后, 用生理盐水按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$, 1 次/d, 连续 6 周。秋水仙碱组($\text{ig } 0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。软肝宁高、中、低剂量组($\text{ig } 0.12, 0.06, 0.03 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)按损伤模型组同法给予 CCl_4 造模, 然后给予软肝宁给药, 1 次/d, 连续给药 6 周后检测大鼠血清中的谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)、血清透明质酸(HA)、层黏连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)和羟脯氨酸(HYP), 并观察大鼠肝组织常规病理改变。结果: 软肝宁能改善肝纤维化大鼠的肝功能, 具有剂量依赖性地使升高的血清 ALT、AST 水平降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 使降低的 ALB 水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 软肝宁高、中剂量可显著降低血清 HA、LN、PCⅢ水平和肝组织中过高的 HYP($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 同时常规病理也提示, 软肝宁中、高剂量组可明显减轻 CCl_4 所致的大鼠肝细胞变性、坏死及肝组织损害程度。结论: 软肝宁对 CCl_4 诱导的大鼠肝纤维化有良好的防治作用。

[关键词] 软肝宁; 肝纤维化; 四氯化碳;

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)14-0205-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120515.1559.023.html>

[网络出版时间] 2012-05-15 15:59

[收稿日期] 20120220(001)

[基金项目] 南京军区南京总医院课题(2010M006)

[第一作者] 闫冰, 医学博士, 主管药师, 研究方向为中药复方机制及药效学研究, Tel:13921430009, E-mail: arain515@sina.com

[通讯作者] *王曙东, 医学博士, 主任药师, 研究方向为中药复方机制及药效学研究, Tel:025-80860161, E-mail: 21324375@qq.com

川芎嗪还可降低血脂水平而维持内皮细胞正常的生理功能。因此, 川芎嗪靶向内皮细胞干预 AS 早期始动环节, 抑制泡沫细胞形成产生抗 AS 作用; 川芎嗪对整体 AS 具有良好的治疗作用, 拓展了目前其在临床的适应症, 为 AS 的防治提供了新思路。

[参考文献]

- [1] 姜宏, 施广飞, 朱珠. 川芎嗪对心血管作用研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(5): 484.
- [2] 刘会芳. 川芎嗪对心血管系统的作用及机制研究进展[J]. 中国药房, 2007, 18(9): 706.
- [3] 张淑娟, 王振涛, 韩丽华, 等. 川芎嗪注射液对心肌梗后大鼠缺血心肌血管新生及 VEGF-mRNA 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(7): 170.
- [4] 任志强, 孙兰军. 川芎嗪的心血管药理作用[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(5): 570.
- [5] Puntmann V O, Bigalke B, Nagel E. Characterization of the inflammatory phenotype in atherosclerosis may contribute to the development of new therapeutic and preventative interventions[J]. Trends Cardiovasc Med,

2010, 20(5): 176.

- [6] 马悦颖, 刘建勋, 李澎, 等. 痰瘀同治方含药血清对 ox-LDL 损伤人脐静脉内皮细胞 NF- κ B 和 ICAM-1 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 140.
- [7] 邬伟魁, 张海燕, 宋伟, 等. 中药对内皮祖细胞的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 282.
- [8] Moore K J, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Cell, 2011, 145(3): 341.
- [9] Sun C, Wu M H, Yuan S Y. Nonmuscle myosin light-chain kinase deficiency attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via reduced endothelial barrier dysfunction and monocyte migration [J]. Circulation, 2011, 124(1): 48.
- [10] van Tits L J, Stienstra R, van Lent P L, et al. Oxidized LDL enhances pro-inflammatory responses of alternatively activated M2 macrophages: a crucial role for Krüppel-like factor 2 [J]. Atherosclerosis, 2011, 214(2): 345.

[责任编辑 聂淑琴]