

丹参-山楂协同抗大鼠动脉粥样硬化的实验研究

王伟^{1,2}, 杨滨², 王岚², 梁日欣^{2*}, 陈承瑜², 胡楠², 成龙², 杨艳², 殷小杰², 高双荣²

(1. 石家庄以岭药业股份有限公司, 石家庄 050035; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] **目的:** 观察丹参-山楂提取物(水浸膏)单用及合用对大鼠动脉粥样硬化模型的干预, 探讨两药间的交互协同作用。**方法:** 雄性 Wistar 大鼠随机分为空白对照组和造模组, 造模组采用 ip 维生素 D₃ 叠加卵清白蛋白激发免疫反应的方法, 在高脂饮食的基础上诱导大鼠动脉粥样硬化(AS)。造模 8 周确定造模成功后, 将造模动物分为模型组, 丹参组, 山楂组, 丹参-山楂合用组。各组经口给予相应的药物, 连续 4 周。给药结束后, 检测各组大鼠血脂水平和丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、NO 水平。苏木素伊红(HE)染色观察主动脉组织形态学变化。**结果:** 各给药组均可降低 TC, TG, 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C), MDA 水平, 提高高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), SOD, NO 水平, 合用组效果更明显($P < 0.05$)。**结论:** 山楂丹参具有协同作用, 二者联用效果更明显。

[关键词] 动脉粥样硬化; 丹参; 山楂; 协同作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0212-05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120731.0957.002.html>

[网络出版时间] 2012-07-31 9:57

Cooperative Effect of Salvia Miltiorrhiza and Hawthorn for Resisting Atherosclerosis in Rats

WANG Wei^{1,2}, YANG Bin², WANG Lan², LIANG Ri-xin^{2*}, CHEN Cheng-yu²,
HU Nan², CHENG Long², YANG Yan², YIN Xiao-jie², GAO Shuang-rong²

(1. Shijiazhuang Yiling Pharmaceutical Co., LTD, Shijiazhuang 050035, China;

2. Institute of Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate anti-atherosclerosis effect in rats of the extracts of Radix Salviae Miltiorrhizae (RSM), Fructus Crataegi (FC), as well as their interaction. **Method:** Male Wistar rats were randomly divided into 2 groups: normal group and model group. The atherosclerotic model was established by injection of VD₃ and ovalbumin, while fed with high cholesterol diet. After the model was determined successfully, all model rats were divided into normal group, model group, RSM group, FC group, mixture of RSM and FC group. Each group was given the corresponding drug for 4 weeks. After the end of treatment, blood serum were analyzed for blood-fat levels, the contents of MDA, SOD and NO, observing ortic organization morphological changes by the method of (HE) dyeing. **Result:** The TC, TG, LDL-C and MDA level were reduced, while the HDL-C, the serum SOD, NO were raised in the drug intervention groups. And for many indexes, there was obvious ($P < 0.05$) effect for the mixture of RSM and FC group. **Conclusion:** RSM and FC show synergistic effect, the combined effect is better.

[Key words] atherosclerosis; Radix Salviae Miltiorrhizae; Fructus Crataegi; synergy

[收稿日期] 20120319(249)

[基金项目] 科技部国际合作项目(2006DFB31720); 中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(ZZ2007046)

[第一作者] 王伟, 硕士, 从事中药药理研究, Tel: 010-64014411-2948, E-mail: sunny215.happy@163.com

[通讯作者] * 梁日欣, 博士, 研究员, 从事中药药理研究, Tel: 010-64014411-2948, E-mail: liangrixin2009@sina.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种多因素参与的疾病,发病机制错综复杂。脂质入侵、血小板活化、血栓形成、内膜损伤、炎性反应、氧化应激、血管平滑肌细胞(VSMC)激活、选择性基质代谢及血管重建等因素均参与其中^[1]。近年来 Ross 提出的炎症免疫学说得到了广泛的重视。与现代医学相比,中医论治注重整体观念,配伍是中药的精髓,这也使得中医药在 AS 的防治上显示了不可替代的作用^[2]。丹参具有活血化瘀、凉血消痈之功效,在临床广泛应用于血瘀证;山楂消食化积、行气散瘀。近年来,许多学者对此两味中药的配伍进行了大量的实验研究,我们在前期实验研究中也证明了丹参和山楂配伍可以抑制大鼠主动脉壁 AS 斑块的形成,同时降低血脂及 MDA 水平;本文旨在前期工作基础上,采用大鼠免疫损伤动物模型,进一步探讨丹参-山楂合用对 AS 的影响,进而了解二药间的协同作用。

1 材料

1.1 药材 丹参-山楂药材均购于山东平邑县铜石镇山东鲁安中药饮片厂。

1.2 动物 Wistar 大鼠,SPF 级,雄性,体重(200 ± 20)g,由军事医学科学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(军)2007-004。

1.3 仪器 全自动脱水机(Shandon Excelsior ES);石蜡包埋机(Shandon Histocentre 3);轮转式切片机(Shandon Finesse 325);全自动染色机(Shandon Varistain Gemini);BX51 自动照相生物显微镜及图像分析系统(Olympus);GF-D800 型半自动生化分析仪(山东高密彩虹分析仪器有限公司)。

1.4 试剂 维生素 D3(VD₃,上海通用药业股份有限公司,批号 090405);完全福氏佐剂(F5881)、卵清白蛋白(A5253)均购于美国 Sigma 公司;中性树胶、苏木精、伊红 Y(曙红)(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为 20080615,20081204,20080902)。血脂康胶囊(北大维信生物科技有限公司,批号 20090306)。总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒(北京北化康泰临床试剂有限公司,批号分别为 0792-2008,0801-2008,0521-2008,0160-2008)。超氧化物歧化酶(SOD),丙二醛(MDA),一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成试剂有限公司,批号分别为 20090917,20091013,20091013)。

2 方法

2.1 丹参和山楂提取物的制备 丹参水提取物:称

取丹参 3.0 kg,以 10 倍量水回流提取 1 h,纱布滤过,于水浴锅上蒸至浸膏状,得浸膏 1.70 kg(含生药 1.8 g·g⁻¹);山楂水提取物:称取山楂 3.0 kg,以 10 倍量水回流提取 1 h,纱布滤过,于水浴锅上蒸至浸膏状,得浸膏 1.44 kg(含生药 2.1 g·g⁻¹);山楂丹参合煎剂:称取山楂 1.5 kg,丹参 1.5 kg,共计 3.0 kg,以 10 倍量水回流提取 1 h,纱布滤过,于水浴锅上蒸至浸膏状,得浸膏 1.51 kg(含生药 2.0 g·g⁻¹,其中山楂 1.0 g,丹参 1.0 g)即得合煎总水提取物。

2.2 高脂饲料的配方 1%胆固醇、0.2%牛胆盐、10%猪油、10%蛋黄粉、78.8%基础饲料,由北京科澳协力饲料有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2005-007。

2.3 模型制备^[3-7] 大鼠适应性喂养 1 周后,随机留取 13 只为空白对照组,喂饲普通饲料,其余 70 只造模:①喂饲高脂饲料;②一次性 ip VD₃ 60 万 U·kg⁻¹;③第 2 天进行免疫损伤:背部多点 sc 由卵清白蛋白(OVA)和完全福氏佐剂制成的油包水型抗原乳剂 1 mL(OVA 含量为 3 mg·kg⁻¹,二者比例 1:1),3 周后以 1 mL OVA 溶液(2.5 mg·kg⁻¹) ip 激发免疫反应,1 次/周,共 3 次;④隔天给予瓜子 30 g,改善其肠胃,增强抵抗力。于造模 8 周后随机抽取对照组 1 只,造模组 5 只观察主动脉的病理形态学变化,以观察到主动脉 AS 病变为确定造模成功。

2.4 分组及给药 将造模大鼠按血清 TC 水平随机分为模型组、血脂康组(0.216 g·kg⁻¹)、丹参组(2.16 g·kg⁻¹),山楂组(2.16 g·kg⁻¹)、丹参-山楂合用组(4.32 g·kg⁻¹),每组 12 只。空白组和模型组予等容积生理盐水。均于第 9 周开始 ig,1 次/d,连续 4 周。期间观察动物生长、死亡与进食情况。

2.5 指标测定

2.5.1 标本采集及处理 实验 12 周末,将每组存活动物 ip 乌来糖(1.0 mg·kg⁻¹)麻醉后腹主动脉取血约 6 mL,分为抗凝血和非抗凝血;之后自主动脉弓根部至腹主动脉分叉处剪下主动脉,剥离结缔组织,生理盐水冲洗干净,固定于 4% 多聚甲醛溶液中,以备作 HE 染色。

2.5.2 血脂水平和抗氧化指标 TC, TG, HDL-C, LDL-C, MDA 含量及 SOD 活性均用酶学法测定。

2.5.3 血管活性物质 NO 采用硝酸还原法测定。

2.5.4 病理形态学观察 将固定的主动脉取材修块后,常规制片,厚度 4 μm,行 HE 染色,光学显微镜下观察主动脉各层的病变情况,并按照表 1 进行主动脉病变分级评分。

表 1 主动脉病变分级评分标准

评分/分	病理分级	主动脉病变情况
0	-	动脉各层结构正常,未见病变
1	+	动脉内皮下偶见少量泡沫细胞灶性积聚,未见明显的粥样斑块
2	++	动脉壁呈节段性病变,内皮下可见大量泡沫细胞积聚,并形成局部隆起
3	+++	动脉内膜下可见粥样斑块形成,几乎累及全部动脉壁,粥样斑块内可见组织坏死、胆固醇结晶、组织钙化,粥样斑块底部的肌层受压萎缩变薄

2.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计处理,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析;并对山楂、丹参各提取物对 AS 的影进行析因分析;各组主动脉病变分级组间多重比较采用非参数秩和检验。统计学显著性设定 $P < 0.05$ 。

3 结果

3.1 模型的鉴定 造模 8 周后,抽样观察 5 只造模组大鼠主动脉的病变情况,按照表 1 进行分级评分,主动脉病变率达到 80% (卅级 1 只,卅级 2 只, + 级 1 只, - 级 1 只),表明造模成功。

3.2 对 AS 大鼠血脂及抗氧化指标的影响 各给药组对 TC, TG, HDL-C 均有明显的改善作用 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$),且合用组比单用山楂、丹参的效果稍好,各给药组对 LDL-C 含量也有改善趋势,仅合用组有统计学意义 ($P < 0.05$)。对血脂的析因分析显示,在改善 TC, HDL-C, LDL-C 水平上,丹参、山楂有协同作用 ($P < 0.05$)。见表 2 ~ 3。

各给药组均能降低 AS 大鼠 MDA 含量 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$)。析因分析显示,在降低 MDA 含量的作用上,丹参、山楂有协同作用 ($P < 0.01$)。各给药组均明显升高 NO 含量 ($P < 0.001$),合用组优于其他组。析因分析显示丹参、山楂二者有协同作用 ($P < 0.01$)。见表 4 ~ 5。

表 2 丹参-山楂及其合用对 AS 大鼠血脂的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TC	TG	HDL-C	LDL-C
空白	-	$2.15 \pm 0.37^{3)}$	$0.54 \pm 0.09^{2)}$	$0.84 \pm 0.25^{2)}$	$1.94 \pm 0.42^{2)}$
模型	-	5.59 ± 1.10	0.71 ± 0.14	0.46 ± 0.12	4.10 ± 1.14
血脂康	0.216	$3.47 \pm 0.48^{2)}$	$0.55 \pm 0.12^{2)}$	$0.64 \pm 0.13^{2)}$	4.89 ± 1.27
丹参	2.16	$3.39 \pm 0.52^{1)}$	$0.56 \pm 0.12^{2)}$	$0.79 \pm 0.16^{3)}$	2.79 ± 0.50
山楂	2.16	$3.83 \pm 0.65^{1)}$	$0.57 \pm 0.13^{1)}$	$0.73 \pm 0.24^{1)}$	2.83 ± 0.42
丹参-山楂	4.32	$3.20 \pm 0.52^{2)}$	$0.53 \pm 0.07^{2)}$	$0.81 \pm 0.12^{3)}$	$2.59 \pm 0.32^{1)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$,³⁾ $P < 0.001$ (表 3 ~ 5 同)。

表 3 丹参-山楂及其合用对 AS 大鼠血脂水平的析因分析

因素	TC		TG		HDL-C		LDL-C	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
丹参	21.914	0.000 ³⁾	6.259	0.018 ¹⁾	10.633	0.003 ²⁾	10.691	0.003 ²⁾
山楂	25.803	0.000 ³⁾	4.397	0.044 ¹⁾	6.825	0.014 ¹⁾	11.682	0.002 ²⁾
丹参-山楂	4.432	0.043 ²⁾	1.887	0.179	5.412	0.026 ¹⁾	5.668	0.023 ¹⁾

表 4 丹参-山楂及其合用对 AS 大鼠抗氧化指标影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	MDA/ $mmol \cdot L^{-1}$	SOD/ $U \cdot mL^{-1}$	NO/ $\mu mol \cdot L^{-1}$
空白	-	$2.89 \pm 0.92^{3)}$	$338.54 \pm 16.51^{1)}$	$47.83 \pm 6.88^{3)}$
模型	-	5.60 ± 0.60	320.07 ± 11.01	27.03 ± 6.73
血脂康	0.216	$4.89 \pm 1.27^{1)}$	324.28 ± 10.33	$43.68 \pm 7.89^{3)}$
丹参	2.16	$4.27 \pm 0.72^{2)}$	$335.70 \pm 15.59^{1)}$	$43.76 \pm 7.73^{3)}$
山楂	2.16	$3.68 \pm 0.71^{3)}$	330.04 ± 9.91	$42.40 \pm 8.94^{3)}$
丹参-山楂	4.32	$3.76 \pm 0.79^{3)}$	327.01 ± 14.22	$44.06 \pm 6.47^{3)}$

表 5 丹参-山楂及其合用对 AS 大鼠 MDA, SOD, NO 影响的析因分析

因素	MDA		SOD		NO	
	F	Sig.	F	Sig.	F	Sig.
丹参	26.328	0.000 ³⁾	2.149	0.152	8.670	0.006 ²⁾
山楂	7.016	0.012 ¹⁾	0.022	0.882	11.946	0.002 ²⁾
丹参-山楂	8.920	0.005 ²⁾	4.717	0.057	8.019	0.008 ²⁾

3.3 病理形态学观察 HE 染色切片显示,正常组大鼠动脉内膜光滑平坦;模型组大鼠主动脉血管腔内多可见混合性血栓,主动脉壁呈节段性硬化,多处有粥样斑块形成,斑块内可见坏死或胆固醇结晶、蓝色钙化灶,局部斑块底部的肌层受压萎缩变薄。病变处动脉内皮下可见大量泡沫细胞积聚。各给药组的主动脉病变较模型组均有不同程度减轻,尤其丹参-山楂合煎组效果最明显,除个别动脉见有斑块外,大部分动物的动脉内皮下仅见少量泡沫细胞聚集。主动脉病变分级结果示,丹参-山楂组主动脉病变较模型组均有减轻趋势,但无显著性统计学意义;丹参-山楂合煎组的主动脉病变与模型组比较明显减轻($P < 0.05$),从形态学角度进一步印证了丹

参-山楂合用效果更佳。见表 6。

表 6 各组动物的主动脉病变分级评分

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	分级				平均秩次
			+++	++	+	-	
空白	-	8	0	0	0	8	10.50 ^{2,3)}
模型	-	13	5	4	2	2	41.31 ³⁾
血脂康	0.216	12	3	5	1	3	37.38 ³⁾
丹参	2.16	10	3	1	4	2	34.95 ³⁾
山楂	2.16	12	2	3	5	2	34.00 ³⁾
丹参-山楂	4.32	8	0	1	4	3	23.63 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与合煎组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

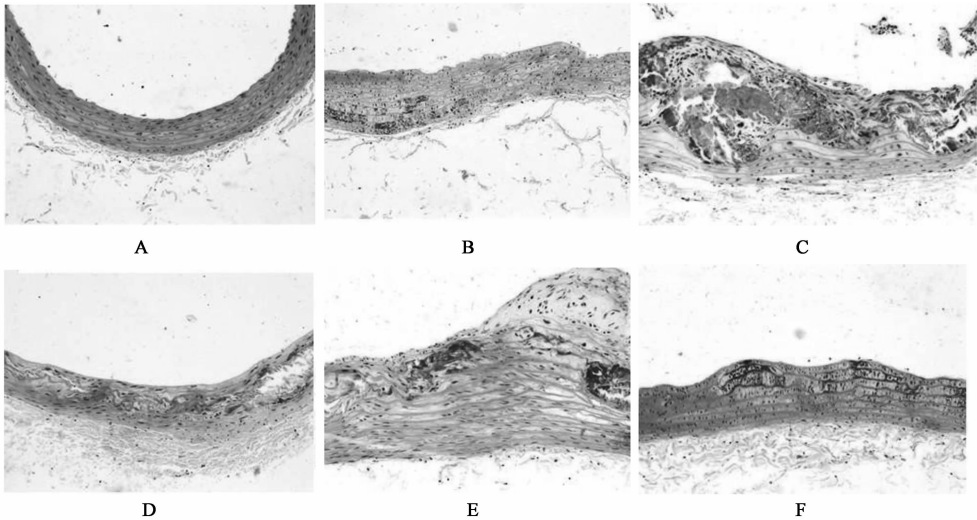


图 1 丹参、山楂及其合用对各组大鼠主动脉病变的影响 (HE, ×200)
 A. 空白组:主动脉各层结构正常,内膜光滑平坦;B. 模型组:主动脉内膜下可见粥样斑块,斑块内有坏死组织及钙化,斑块下肌层受压;
 C. 血脂康组:主动脉内膜下可见粥样斑块形成,斑块内有钙化及坏死;D. 丹参组:主动脉内膜下可见泡沫细胞聚集,并见钙化组织;
 E. 山楂组:主动脉内膜下可见少量的泡沫细胞及钙化灶;F. 丹参-山楂合煎组:主动脉中膜内可见少量钙化组织

4 讨论

大量实验证明活血化瘀中药单味药和复方能通过调节血脂代谢、抑制血管平滑肌增生和迁移、抗氧化、保护血管内皮细胞等多个环节减轻动脉粥样硬化病变^[8-9]。丹参作为活血化瘀类的代表药一直是研究的热点,其药理研究及临床应用范围非常广泛,

迄今的研究表明,丹参中的脂溶性和水溶性成分均表现出了一定的抗 AS 活性,可干预 AS 发生发展的各个病理阶段^[10-11]。在心血管临床和药理研究方面,山楂是另一味值得关注的中药。其主要成分有金丝桃苷、槲皮素、芦丁等黄酮类成分和柠檬酸、山楂酸、延胡索酸、熊果酸等有机酸类成分。现代研究

证明,山楂不同提取部分对不同动物造成的各种高脂模型均有较为肯定的降血脂作用^[12]。而山楂叶中的黄酮类成分是公认最具抗氧潜力的一类化合物^[13]。山楂果中原花青素具有较强的清除自由基和抑制脂质氧化的能力^[14]等等。而高血脂症和自由基紊乱对机体产生的一系列危害是 AS 疾病的公认的重要危险因素^[15]。山楂抗 AS 越来越受到人们的重视。

虽然近些年来不少学者对丹参,山楂进行了广泛而深入的研究,但绝大多数的研究关注点为单一中药或者有效成分。本实验则采用析因设计的方法,探讨药的相互作用。析因设计是一种多因素的交叉分组试验设计,它不仅可以检出每个因素各水平的差异(本实验为山楂、丹参 2 个因素;“用”、“不用”2 个水平),而且可检验各因素的交互作用^[16]。因此,本研究的重点不只在观察单味药物的疗效,更重要是探讨分析二味药物在复方中的关系及其交互作用。从本实验的结果可以看出:对于 AS 的多个指标,不但山楂、丹参单味药有明显的改善作用,且在 TC, HDL, LDL, MDA 和 NO 含量等指标上二药的协同交互作用均具有统计学意义。而在其他指标上析因分析虽然没有统计学意义,但也不难看出二药合用的效果优于单味药组。且病理结果显示,合用组的效果远比单味药组明显,从形态学角度也为我们提供了可靠的证据。本实验为二药在临床上科学地、合理地配伍组方提供了有力的理论支持。

[参考文献]

[1] Libby P, Ridker P M, Maseri A. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, 105(9): 1135.

[2] 刘应柯. 中医药抗动脉粥样硬化研究述评[J]. *中医文献杂志*, 2006, 1: 50.

[3] 樊继山, 李晓辉, 李淑慧, 等. 大鼠动脉粥样硬化病变组织致炎-抗炎因子抗体芯片分析[J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(3): 210.

[4] 王园园, 龙民慧, 邹民吉, 等. 大鼠动脉粥样硬化动物模型的建立和评价[J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(6): 421.

[5] 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方法[J]. *中国老年学杂志*, 2001, 21(1): 50.

[6] 孙安阳, 俞彰, 钟慈声, 等. 大鼠动脉钙超负荷模型的建立及确证[J]. *中华医学杂志*, 1999, 79(10): 769.

[7] Susanne Zadelaar, Robert Kleemann, Lars Verschuren, et al. Models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(8): 1706.

[8] 罗尧岳, 周小青, 谢小兵, 等. 活血化瘀类方对动脉粥样硬化家兔血脂、血液流变学变化的影响[J]. *湖南中医学院学报*, 2003, 23(1): 9.

[9] 焦亚斌, 李冀, 肖红兵, 等. 活血化瘀法对实验性高脂血症大鼠调血脂作用的研究[J]. *中医药信息*, 2002, 19(6): 55.

[10] 张发艳, 华声瑜, 范英昌. 丹酚酸 B 及丹参酮 II_A 对家兔动脉粥样硬化 IL-8 及 VCAM-1 的影响[J]. *山东中医药大学学报*, 2006, 30(2): 152.

[11] 张艳军, 张发艳, 范英昌. 丹酚酸 B、丹参酮 II_A 对家兔动脉粥样硬化模型内皮细胞功能的影响[J]. *天津中医药*, 2005, 22(4): 328.

[12] 李贵海, 孙敬勇, 张希林, 等. 山楂降血脂有效成分的实验研究[J]. *中草药*, 2002, 33(1): 50.

[13] 曾绍晖, 颂晓虹, 赵彪. 山楂叶茶水提取物抗氧自由基作用的研究[J]. *首都医科大学学报*, 1996, 21(14): 245.

[14] 金宁, 刘通讯. 山楂原花青素的抗氧化活性研究[J]. *食品与发酵工业*, 2007, 33(1): 45.

[15] Tomkin G H. Hyperglycaemia: the relation to dyslipidaemia and atherosclerosis [J]. *Ir J Med Sci*, 2002, 171(3): 161.

[16] 孙振球. *医学统计学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 181.

[责任编辑 何伟]