

· 药理 ·

## 痰瘀同治方对大鼠颈总动脉粥样硬化易损斑块稳定性的影响

王建辉, 李磊, 柳芳, 史跃, 马彦雷, 刘建勋\*

(中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

**[摘要]** **目的:**探讨痰瘀同治方对大鼠颈总动脉粥样硬化(AS)易损斑块稳定性的影响。**方法:**采用高脂、高蛋白氨基酸喂养, 4周末行颈总动脉球囊拉伤术造模, 术后将大鼠随机分为空白对照组、模型组、辛伐他汀组、复方维生素组、痰瘀同治方(TY TZ) 7.8, 3.9, 1.95 g·kg<sup>-1</sup>组, 连续ig 8周。实验结束后, 测定各组血清同型半胱氨酸(Hcy)、血清基质金属蛋白酶-9(MMP-9), 基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)和斑块中MMP-9, TIMP-1阳性表达。**结果:**与模型组比较, 辛伐他汀组、复方维生素组和痰瘀同治方7.8, 3.9 g·kg<sup>-1</sup>组血清MMP-9降低并TIMP-1升高, 斑块中MMP-9阳性表达降低。**结论:**痰瘀同治方可通过调节MMP-9/TIMP-1起到稳定颈总动脉粥样硬化易损斑块的作用。

**[关键词]** 基质金属蛋白酶-9; 基质金属蛋白酶抑制因子-1; 斑块稳定

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0136-04

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20110823.1119.016 **[网络出版时间]** 2011-08-23 11:19

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110823.1119.016.html>

## Influence of Tanyu Tongzhi Formula on Stability of Atherosclerotic Vulnerable Plaque of Carotid Artery in Rats

WANG Jian-hui, LI Lei, LIU Fang, SHI Yue, MA Yan-lei, LIU Jian-xun\*

(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effects of Tanyu Tongzhi (TYTZ) formula on stability of vulnerable atherosclerotic plaque of carotid artery in rats. **Method:** With high cholesterol lipid and 2% L-methionine feeding for four weeks, the vulnerable atherosclerotic plaque model was reproduced by operation on carotid artery endothelium for inducing sacculus pull injury. Rats were randomized into five groups: normol control group, model group, simvastatin group, vitamin complex group, TYTZ group (7.8, 3.9, 1.95 g·kg<sup>-1</sup>) and administrated orally for 8 weeks. At the end, the blood sample was collected to measure the concentration of Hcy, MMP-9 and TIMP-1, the protein contents of MMP-2 and TIMP-2 in plaque were detected by immunohistochemistry. **Result:** In contrast to model group, TYTZ (7.8, 3.9 g·kg<sup>-1</sup>), simvastatin and vitamin complex decreased the concentration of serum MMP-9 and increased the concentration of TIMP-1, the expression of MMP-9 detected in plaque was also lower. **Conclusion:** TYTZ formula could stabilize the vulnerable atherosclerotic plaque of carotid artery through mediating MMP-9 and TIMP-1.

**[Key words]** matrix metalloproteinase-9; tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1; stability of plaque

**[收稿日期]** 2011-07-06

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81073085);重大新药创制(2009zx09301-005;2009zx09303-003)

**[第一作者]** 王建辉, 硕士研究生, 从事心脑血管药理学研究, E-mail: wangjianhui1983@126.com

**[通讯作者]** \*刘建勋, 研究员, 博士生导师, 从事心脑血管药理学研究, Tel/Fax: 010-62835601, E-mail: liujx0324@sina.com

动脉粥样硬化(AS)易损斑块破裂及其导致血栓形成是临床心脑血管疾病的主要病因之一,在AS的临床治疗中,稳定斑块为众多临床医生所重视。目前,大量研究表明斑块内基质降解与斑块稳定性相关,尤其是基质金属蛋白酶及其抑制因子系统(MMPs/TIMPs)与斑块稳定性关系密切。

痰瘀同治方(TY TZ)由川芎、栀子、山楂、红曲等7味中药组成。应用不同提取工艺提取有效成分,按一定比例配方而成,具有活血祛瘀、祛痰通脉之功效。前期研究表明TY TZ有显著抗AS作用,其作用途径与调节血脂、抗炎、保护对氧磷酶-1(PON-1)活性有关<sup>[1]</sup>。本文通过高脂、高蛋氨酸喂养加球囊拉伤建立大鼠颈总动脉易损斑块模型<sup>[2]</sup>,观察TY TZ对模型血清及斑块内MMP-9、TIMP-1活性的干预作用,探讨TY TZ稳定斑块的具体机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级SD大鼠,雄性,体重(260±10)g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号SCXX(京)2007-0001。喂养7d后实验。

**1.2 药物和试剂** TY TZ药粉由中国中医科学院西苑医院实验研究中心药学室提供,含生药3.69g/g粉;辛伐他汀片(simvastatin),杭州默沙东制药有限公司,批号09547;叶酸(folic acid)、维生素B<sub>6</sub>(Vit B<sub>6</sub>)、维生素B<sub>12</sub>(Vit B<sub>12</sub>),均为Sigma进口分装产品,纯度均>99%。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)ELISA试剂盒(GBD公司,批号M064-10);基质金属蛋白酶抑制因子-1(TIM P-1)ELISA试剂盒(GBD公司,批号T035-10);MMP-9抗体(英国ABCAM公司,批号887896);TIM P-1抗体(英国ABCAM公司,批号为910221);山羊抗兔IgG/辣根酶标记(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号为87987)。高脂高蛋氨酸饲料配方:2% L-蛋氨酸、88.5%维持鼠料、0.5%胆酸钠、2%胆固醇、7%猪油(北京科澳协力饲料有限公司);L-蛋氨酸(美国Camycal公司,纯度>95%)。

**1.3 仪器** 2.0 F动脉去栓导管(美国Fogarty公司),台式高速冷冻离心机(德国Hettich公司),分析天平(美国Mettler公司),酶标仪(美国Biotek公司),光学显微镜(日本Olympus)。

## 2 方法

### 2.1 分组与造模

**2.1.1 分组与给药** 将56只大鼠随机分为7组,

每组8只。分别为空白对照组、模型组、辛伐他汀组( $5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、维生素组( $10.5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )、痰瘀同治方7.8,3.9,1.95  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。空白对照组喂养正常饲料,模型组及各给药组喂养高脂、高蛋氨酸饲料,持续整个实验。模型组与各给药组于实验4周末时行颈总动脉拉伤术。术后各组开始按剂量ig,持续8周。实验结束后,大鼠ip 4%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血;钝性分离大鼠右侧颈总动脉,取颈总动脉全长,置10%中性福尔马林中固定备用。

**2.1.2 大鼠颈总动脉球囊拉伤术** SD大鼠高脂、高蛋氨酸饲料喂养4周后,体重300~350g,禁食12h,不禁水。ip 4%水合氯醛麻醉,沿颈前正中中线无菌切开皮肤,在颈前三角区暴露右颈内、外及颈总动脉,结扎右颈外动脉远心端,用微动脉夹阻断右颈总动脉近心端及右颈内动脉血流,于右颈外动脉远心端下用眼科剪剪“V”字形切口,置入2.0 F动脉去栓导管(预先用1:15稀释的肝素钠生理盐水浸润)至颈总动脉分叉下3cm,视情况打入0.1~0.2mL气体,使其充分扩张至有轻度阻力感,然后匀速回拉球囊至颈总动脉分叉处,反复进行3次,完成后回抽球囊内气体,取出导管,结扎右颈外动脉,恢复颈总动脉血流。无菌缝合切口,局部给予青霉素消毒。

### 2.2 指标检测

**2.2.1 血浆同型半胱氨酸(Hcy)测定** 采用电化学高效液相色谱法。色谱条件:流动相为10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二铵,12  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 辛烷基磺酸钠,10%甲醇,pH 2.5±0.01。ESA 582液相泵流速为1  $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,电势+450,+800mV,柱温30℃,进样量10  $\mu\text{L}$ 。

**2.2.2 血清MMP-9、TIMP-1水平测定** 采用酶联免疫法(ELISA)检测血清MMP-9与TIMP-1的浓度,实验步骤严格按照试剂盒说明书操作。

**2.2.3 病理组织学测量** 实验选取病变显著处包埋切片,厚度3~4  $\mu\text{m}$ ,间隔10  $\mu\text{m}$ 。分别行HE染色及免疫组织化学染色。HE染色测量:光镜( $\times 10$ 倍)下,应用Anymicro Dss显微数码图像拍摄系统V5.1进行图像采集,应用IDA-2000数字医学图像分析系统进行组织形态学分析(定标为10倍像素点长)。免疫组化测量:光镜 $\times 40$ 倍下,应用Anymicro Dss显微数码图像拍摄系统V5.1进行图像采集,每个血管选取5个不同视野,应用Image-Pro Plus 6.0 software图像软件分析,计算MMP-9、TIMP-1阳性表

达吸光度  $A$ , 并计算 MMP-9 与 TIMP-1 阳性表达平均  $A$  的比值。所有图像采集及测量均在相同条件下进行。检测斑块部位外弹性膜面积 (EEM-A); 斑块部位内弹性膜面积 (IEL-A); 血管腔面积 (LA); 斑块部位血管腔内的面积; 斑块面积 (PA); 斑块部位内弹性膜内的面积与斑块部位血管腔内的面积之差; 校正斑块面积 (PA/EEM-A); 管腔狭窄率 (PA/IEL-A); MMP-9 阳性表达: 视野中 MMP-9 免疫组化阳性染色面积的吸光度; TIMP-1 阳性表达: 视野中 TIMP-1 免疫组化阳性染色面积的吸光度。

**2.3 统计方法** 数据均采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析, 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 数据正态性检验采用 One-Sample K-S 检验, 方差齐性检验采用 Levene 检验, 若数据符合正态分布、方差齐, 则应用单因素方差分析, 反之则采用独立样本  $t$  检验。  $P < 0.05$  为有显著性差异。

### 3 结果

**3.1 血浆 Hcy 浓度** 与空白对照组比较, 模型组血浆 Hcy 显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, TYTZ 高、中剂量显著降低血浆 Hcy 水平 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ ), 维生素组亦显著降低血浆 Hcy 水平 ( $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.2 血清 MMP-9, TIMP-1 浓度** 与空白对照组比较, 模型组血清 MMP-9 浓度升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组血清 MMP-9 均有不同程度降低, 维生素组、TYTZ 高剂量组、辛伐他汀组对血清 MMP-9 的降低作用显著 ( $P < 0.01$ )。与空白对照组比较, 模型组血清 TIMP-1 升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组血清 TIMP-1 均有不同程度升高, 维生素组、TYTZ 高剂量组作用明显 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。见表 1。

表 1 TYTZ 血浆 Hcy, 血清 MMP-9, TIMP-1 浓度变化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 分组   | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | MMP-9<br>/ng·mL <sup>-1</sup> | TIMP-1<br>/ng·mL <sup>-1</sup> | Hcy<br>/μmol·L <sup>-1</sup> |
|------|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| 空白对照 | -                         | 14.03 ± 5.93                  | 1.90 ± 0.67                    | 1.80 ± 0.16                  |
| 模型   | -                         | 50.00 ± 0.00 <sup>2)</sup>    | 5.46 ± 2.42 <sup>2)</sup>      | 14.12 ± 2.33 <sup>2)</sup>   |
| TYTZ | 7.8                       | 24.35 ± 12.83 <sup>4)</sup>   | 12.03 ± 6.87 <sup>3)</sup>     | 7.83 ± 3.00 <sup>4)</sup>    |
|      | 3.9                       | 49.08 ± 9.63                  | 8.56 ± 3.59                    | 9.01 ± 5.43 <sup>3)</sup>    |
|      | 1.95                      | 45.85 ± 7.97                  | 5.66 ± 1.88                    | 11.43 ± 3.90                 |
| 辛伐他汀 | 5 × 10 <sup>-3</sup>      | 21.99 ± 11.88 <sup>4)</sup>   | 8.26 ± 3.65                    | 13.00 ± 6.30                 |
| 维生素  | 10.5 × 10 <sup>-3</sup>   | 20.94 ± 6.91 <sup>4)</sup>    | 13.12 ± 4.05 <sup>4)</sup>     | 4.28 ± 0.65 <sup>4)</sup>    |

注: 与空白对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2 ~ 3 同)。

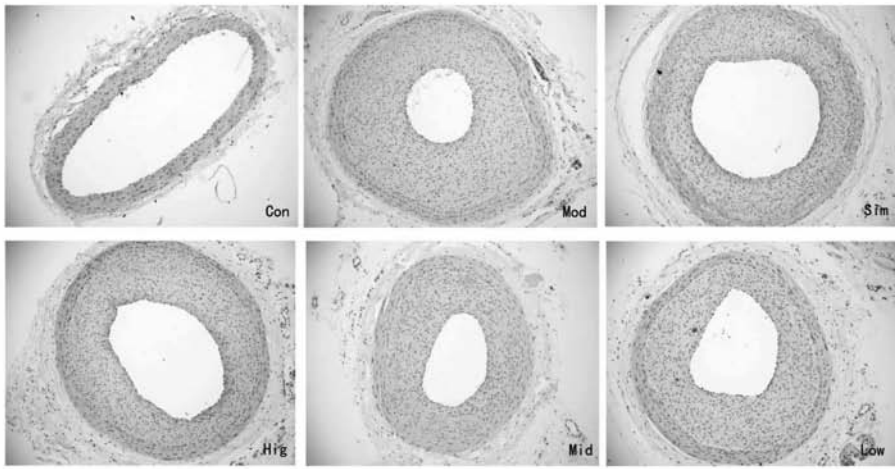
### 3.3 病理形态学测量

**3.3.1 HE 染色斑块测量** 与空白对照组比较, 模型组颈总动脉形成明显的动脉粥样硬化斑块, 斑块狭窄率在 70% 以上; 与模型组比较, 各给药组斑块面积、校正面积及斑块狭窄率均不同程度减轻, 其中以辛伐他汀组、TYTZ 高剂量组的作用显著 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。见表 2 和图 1。

**3.3.2 免疫组化 MMP-9, TIMP-1 检测** 与空白对照组比较, 模型组 MMP-9 阳性表达度升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组 MMP-9 阳性表达均有不同程度下降, 辛伐他汀组、TYTZ 高剂量组的作用显著 ( $P < 0.05$ )。与空白对照组比较, 各组 TIMP-1 阳性表达均有不同程度升高; 与模型组比较, 各给药组 TIMP-1 阳性表达未见显著变化。与空白对照组比较, 模型组 MMP-9/TIMP-1 比值增高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各给药组比值均下降, 其中辛伐他汀组、TYTZ 高剂量组、维生素组的作用显著 ( $P < 0.05$  或  $0.01$ )。见表 3 和图 2。

表 2 TYTZ 对颈总动脉斑块面积及狭窄程度变化的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 分组   | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | 斑块面积<br>/μm <sup>2</sup>            | 校正斑块<br>面积/%                | 管腔狭窄率/%                     |
|------|---------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白对照 | -                         | -                                   | -                           | -                           |
| 模型   | -                         | 119 440.28 ± 25 002.43              | 52.17 ± 8.35                | 72.60 ± 12.88               |
| TYTZ | 7.8                       | 83 653.06 ± 22 236.47 <sup>4)</sup> | 40.43 ± 8.59 <sup>3)</sup>  | 56.81 ± 11.60 <sup>3)</sup> |
|      | 3.9                       | 114 588.34 ± 32 602.70              | 43.59 ± 11.95               | 60.63 ± 18.77               |
|      | 1.95                      | 113 779.82 ± 40 067.99              | 48.27 ± 6.62                | 62.82 ± 6.73                |
| 辛伐他汀 | 5 × 10 <sup>-3</sup>      | 84 472.17 ± 32 890.53 <sup>3)</sup> | 37.75 ± 19.14 <sup>4)</sup> | 53.81 ± 14.26 <sup>3)</sup> |
| 维生素  | 10.5 × 10 <sup>-3</sup>   | 98 504.69 ± 28 107.44               | 44.67 ± 9.68                | 62.52 ± 13.96               |

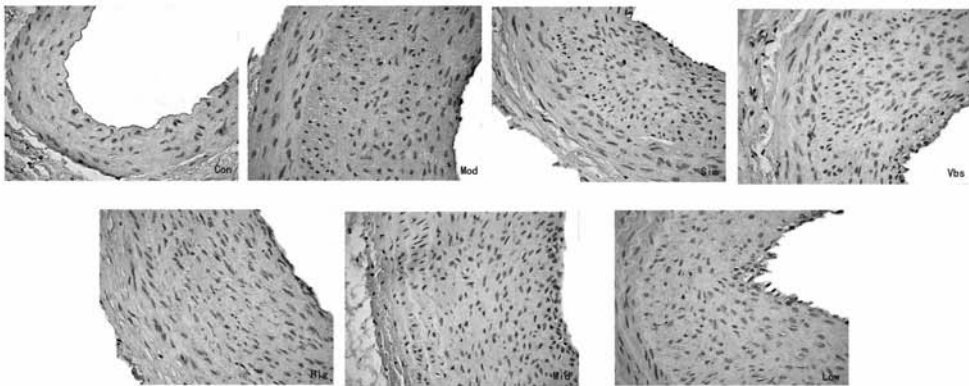


Con 为空白对照组,Mod 为模型组,Hig、Mid、Low 为 TYTZ 高、中、低剂量组,Sim 为辛伐他汀组

图 1 颈总动脉粥样硬化斑块变化(HE, ×10)

表 3 TYTZ 对颈总动脉斑块 MMP-9、TIMP-1 阳性表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

| 分组   | 剂量<br>/g·kg <sup>-1</sup> | MMP-9                         | TIMP-1                        | MMP-9/TIMP-1              |
|------|---------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| 空白对照 | -                         | 126.82 ± 22.57                | 180.37 ± 44.58                | 0.74 ± 0.23               |
| 模型   | -                         | 687.97 ± 25.078 <sup>2)</sup> | 482.76 ± 119.79 <sup>2)</sup> | 1.40 ± 0.28 <sup>2)</sup> |
| TYTZ | 7.8                       | 414.61 ± 138.77 <sup>3)</sup> | 546.58 ± 160.92               | 0.84 ± 0.44 <sup>4)</sup> |
|      | 3.9                       | 503.88 ± 80.12                | 433.52 ± 72.65                | 1.18 ± 0.20               |
|      | 1.95                      | 618.96 ± 185.18               | 395.37 ± 73.52                | 1.56 ± 0.33               |
| 辛伐他汀 | 5 × 10 <sup>-3</sup>      | 355.18 ± 242.50 <sup>3)</sup> | 465.09 ± 38.45                | 0.76 ± 0.49 <sup>4)</sup> |
| 维生素  | 10.5 × 10 <sup>-3</sup>   | 430.41 ± 218.13 <sup>3)</sup> | 450.17 ± 71.93                | 0.96 ± 0.44 <sup>3)</sup> |



注:Con 为空白对照组,Mod 为模型组,Hig、Mid、Low 为 TYTZ 高、中、低剂量组,Sim 为辛伐他汀组,Vbs 为维生素组

图 2 颈总动脉 MMP-9 免疫组化阳性染色变化(×40)

#### 4 讨论

细胞外基质(ECM)是血管壁的主要成分,由血管平滑肌细胞分泌、合成。在动脉粥样硬化疾病中,ECM的合成和降解贯穿于动脉粥样硬化、血管壁重塑的整个过程。正常情况下,ECM处于不断生成和

降解的动态平衡中,其稳态主要由(MMPs/TIMPs)系统调节。MMPs是降解ECM的主要酶类,对ECM有广泛作用,是调节ECM动态平衡的最重要的酶系;TIMPs是近年来发现的MMPs的天然抑制物,是一组能抑制MMPs活性的多功能因子家族,对抑制