

• 药理 •

痰瘀同治方对兔动脉粥样硬化对氧磷酶活性 及炎症因子的影响

李磊, 刘建勋*, 李欣志, 苗兰, 史跃, 马彦雷
(中国中医科学院西苑医院, 北京 100091)

[摘要] 目的: 探讨痰瘀同治方对兔动脉粥样硬化(AS)对氧磷酶活性及炎症因子的影响。方法: 将家兔随机分为正常组、模型组、辛伐他汀组、痰瘀同治方 5, 2.5, 1.25 g·kg⁻¹ 剂量组; 采用主动脉球囊拉伤加高脂喂养造模; 造模 4 周开始给药, 给药 8 周。实验结束后, 测定各组总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平, 血清对氧磷酶-1(PON-1)活性, C 反应蛋白(CRP)和白介素-6(IL-6)含量。结果: 与模型组比较, 辛伐他汀组和痰瘀同治方 5 g·kg⁻¹ 剂量组家兔 TC、LDL-C 明显降低, 痰瘀同治方 5, 2.5 g·kg⁻¹ 剂量组 PON-1 活性较模型组明显升高, 痰瘀同治方各剂量组 CRP、TNF-α 和 IL-6 水平较模型组明显降低。结论: 痰瘀同治方通过调节血脂, 抗炎, 保护 PON-1 活性等途径起到抗 AS 的作用。

[关键词] 动脉粥样硬化; 对氧磷酶; 炎症因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)08-0053-04

Effect of TAN YU TON ZHI Prescription on PON-1 Activity and Inflammatory Factor in Atherosclerosis Rabbits

LI Lei, LIU Jian-xun*, LI Xin-zhi, MIAO Lan, SHI Yue, MA Yan-lei
(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of TAN YU TON ZHI (TYTZ) prescription on PON-1 activity and inflammatory factor in atherosclerosis (AS) rabbits. **Methods:** Rabbits were divided randomly into six groups: normal control group, AS model group, simvastatin group, TYTZ 5, 2.5, 1.25 g·kg⁻¹ group. The animal model of AS was established with a combined method of aortic balloon injury and high cholesterol feeding. Rabbits were administered the drugs 4 weeks after surgery. 8 weeks after drug administration, the levels of TC, TG, HDL-C, LDL-C, PON-1 activity, CRP and IL-6 were determined. **Results:** The levels of TC, LDL-C decreased significant in simvastatin and TYTZ 5 g·kg⁻¹ group than those in model group. The PON-1 activity in TYTZ 5, 2.5 g·kg⁻¹ group were significant higher than model group. The levels of CRP and IL-6 significant decreased in TYTZ 5, 2.5, 1.25 g·kg⁻¹ group than those in model group. **Conclusions:** TYTZ prescription suppresses the development of atherosclerosis by modulating blood lipid, anti-inflammation and protecting PON-1 activity.

[Key words] atherosclerosis; paraoxonase 1; inflammatory factor

[收稿日期] 2009-04-08

[基金项目] 国家自然科学基金重大研究计划(9079001);“十一五”科技支撑计划(2006BAI08B01-6)

[通讯作者] * 刘建勋, Tel(010) 62874049; E-mail: liujx0324@sina.com

动脉粥样硬化(AS)是引起冠心病、脑卒中等心脑血管疾病的主要病理基础。目前,众多研究表明 AS 病变主要是内皮细胞损伤引起的复杂的慢性炎症性反应的结果。血管内皮的慢性炎症过程与氧化修饰低密度脂蛋白(ox-LDL)有关^[1]。内源性抗氧化物质可抑制 ox-LDL 形成,从而具有抗 AS 作用。所以,保护内源性抗氧化物质活性可能为防治 AS 提供新的思路。

血清对氧磷酶-1(PON-1)是一种内源性抗氧化物质。PON-1 存在于血清高密度脂蛋白(HDL)分子中,该酶在人体内因保护 LDL 免受氧化修饰,减低体内 ox-LDL 水平而具有抗 AS 形成的作用。炎症反应在动脉粥样硬化的发生发展中起枢纽性作用。有研究显示 PON-1 活性与炎症反应存在相关性,在急、慢性炎症时 PON-1 活性明显降低^[2]。Kumon^[3]报导白细胞介素 1 β 和肿瘤坏死因数 α 可下调 HepG2 细胞 PON-1 基因表达,而白细胞介素 6 可上调其表达,提示致炎因子可能通过调节肝细胞 PON-1 mRNA 表达影响 PON-1 抗氧化特性进而影响粥样硬化病变发展。

痰瘀同治方(TY TZ)由川芎、栀子、山楂、红曲等 9 味中药组成。应用不同提取工艺提取有效成份,按一定比例配方而成,具有活血化瘀、祛痰通脉之功效。本研究通过球囊拉伤高脂喂养建立兔 AS 模型,观察 PON-1 活性及炎症因子含量变化及痰瘀同治方的干预作用,以期从抗炎和保护 PON-1 活性的角度探讨其抗 AS 的机理。

1 材料

1.1 动物 日本大耳白家兔 36 只,雄性,体重 2.0 ~ 2.5 kg,由北京通利实验动物养殖场提供,合格证号:SCXK(京)2005-0003。在本院动物室饲养 7 d,用于实验。

1.2 药物和试剂 痰瘀同治方粉由中国中医科学院西苑医院实验研究中心药学室提供,3.69 g 生药/g 粉;辛伐他汀(simvastatin),杭州默沙东制药有限公司生产;总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒,均由中生北控生物科技股份有限公司提供,批号分别为:080641,082431,080211,080221;兔 C 反应蛋白(CRP)、兔白介素 6(IL-6)试剂盒,均由尚柏生物技术(北京)有限公司提供,批号分别为:28110817,18120834;高脂饲料,饲料含 2% 胆固醇及 10% 猪油,

由北京科澳协力饲料有限公司生产。乙酸苯酯(PA),由北京百灵威化学技术有限公司提供。

1.3 仪器和器材 BV Pulsera 型 C 型臂 X 光机(PHILIPS 公司);RA-100 型全自动生化分析仪(TECHNICON 公司);8453 型紫外可见分光光度计(Agilent 公司);3F 动脉取血栓导管(LeMaitre Vascular 公司)。

2 方法

2.1 造模与分组 将 36 只家兔随机分为 6 组,每组 6 只。分别是正常组(CON)、模型组(MOD)、辛伐他汀组(SIM)、痰瘀同治方 5, 2.5, 1.25 g·kg⁻¹ 剂量组。正常组喂饲正常饲料 100 g·d⁻¹,模型组和各给药组喂饲高脂饲料 50 g·d⁻¹和正常饲料 50 g·d⁻¹,持续整个实验。模型组和各给药组于实验开始时手术造模。喂养至 4 周,各组开始按体表面积换算剂量灌胃给药,持续 8 周。实验结束后,在清醒状态下经兔中央动脉取空腹血标本用于指标检测。参考文献^[4]方法手术造模,家兔麻醉后分离股动脉,逆行插入 3F 动脉取血栓导管,X 光下确定到达胸主动脉水平。球囊内充以生理盐水 0.2 mL,回拉球囊扩张整个主动脉。

2.2 血清脂质测定 TC, TG 用酶法, HDL-C, LDL-C 用沉淀法,极低密度脂蛋白胆固醇(VLDL-C) = TC - (HDL-C + LDL-C)。

2.3 血清对氧磷酶活性测定 参照文献^[5]略加改动, PON-1 活性以乙酸苯酯(PA)作为底物,于分光光度计 270 nm 处测定。反应缓冲液含 1 mmol·L⁻¹ PA, 1 mmol·L⁻¹ CaCl₂, 20 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 为 8.0。酶的活性单位定义为 1 min 催化 1 μ mol 乙酸苯酯水解所需酶的量。

2.4 血清炎症因子测定 CRP 和 IL-6 浓度测定采用 ELISA 法,严格按照试剂盒说明操作。

2.5 主动脉病变病理检查 分离主动脉,在胸主动脉起始处(球囊拉伤起始处)、髂动脉分叉处(球囊拉伤终止处)及两者中点处分别横行取血管环 0.5 cm,浸入 10% 甲醛中固定,行 HE 染色,光镜观察组织学改变。其余主动脉由腹正中线纵向剪开,用 10% 甲醛固定,苏丹 III 染色,通过计算机图像分析软件算出斑块面积所占动脉壁的百分率。

2.6 统计学方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件对各组数据进行方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异显著。

3 结果

3.1 对家兔血脂代谢的影响 高脂饲料喂养各组 TC, TG 及 LDL-C 均较正常组明显升高, HDL-C 则无明显变化。辛伐他汀组 痰瘀同治方 5, 2.5 g·kg⁻¹ 剂量组 TC, LDL-C 非常显著低于模型组 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 痰瘀同治方对家兔血清血脂代谢的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose (g·kg ⁻¹)	TC (mmol·L ⁻¹)	TG (mmol·L ⁻¹)	HDL-C (mmol·L ⁻¹)	LDL-C (mmol·L ⁻¹)
CON	-	0.58 ± 0.15 ²⁾	0.63 ± 0.29 ²⁾	0.14 ± 0.06	0.30 ± 0.08 ²⁾
MOD	-	35.30 ± 4.61	1.98 ± 0.53	0.11 ± 0.05	32.94 ± 3.65
SIM	2 mg	17.52 ± 8.71 ²⁾	1.50 ± 0.77	0.16 ± 0.09	15.34 ± 8.65 ²⁾
TYTZ	5	14.32 ± 7.03 ²⁾	2.62 ± 1.15	0.10 ± 0.01	12.69 ± 7.10 ²⁾
	2.5	17.42 ± 3.34 ²⁾	2.73 ± 0.27	0.12 ± 0.05	15.68 ± 4.09 ²⁾
	1.25	28.60 ± 12.65	2.18 ± 1.03	0.08 ± 0.04	27.00 ± 12.84

注: CON: 正常对照组; MOD: 模型组; SIM: 辛伐他汀组; TYTZ: 痰瘀同治方组。与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (下同)

3.2 对家兔 PON-1 活性的影响 与正常组比模型组 PON-1 活性显著降低。痰瘀同治方 5 g·kg⁻¹ 剂量组与正常组数值接近, 与模型组比, 其差异非常显著 ($P < 0.01$)。辛伐他汀组和痰瘀同治方 2.5 g·kg⁻¹ 剂量组与模型组比也有显著性差异 ($P < 0.05$), 见表 2。

3.3 对家兔炎症因子水平的影响 模型组 CRP 和 IL-6 和含量较正常组显著升高; 与模型组相比, 痰瘀同治方各剂量组可以降低炎症因子水平, 差异均十分显著 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 痰瘀同治方对家兔 PON-1 活性、炎症因子含量及主动脉面积的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose (g·kg ⁻¹)	PON-1 activity (U·mL ⁻¹)	CRP (ng·mL ⁻¹)	IL-6 (pg·mL ⁻¹)	Plaque area ratio
CON	-	244.91 ± 18.80 ²⁾	72.87 ± 34.60 ²⁾	87.26 ± 27.46 ²⁾	0 ²⁾
MOD	-	128.02 ± 25.44	208.48 ± 97.82	267.97 ± 104.24	0.74 ± 0.13
SIM	2 mg	175.60 ± 50.72	180.33 ± 101.34	218.49 ± 118.24	0.49 ± 0.07 ²⁾
TYTZ	5	218.81 ± 40.85 ²⁾	56.07 ± 42.46 ²⁾	96.04 ± 44.06 ²⁾	0.46 ± 0.12 ²⁾
	2.5	180.69 ± 48.35 ¹⁾	50.20 ± 19.58 ²⁾	84.84 ± 15.94 ²⁾	0.61 ± 0.07 ¹⁾
	1.25	167.17 ± 62.69	48.78 ± 19.78 ²⁾	77.71 ± 16.98 ²⁾	0.71 ± 0.08

3.4 对家兔主动脉病变的影响 镜下观察, 模型组家兔主动脉内膜增厚, 形成明显的粥样斑块, 有大量泡沫细胞聚集; 辛伐他汀组和痰瘀同治方 5, 2.5 g·kg⁻¹ 剂量组主动脉斑块比值较模型组均有显著下降, 主动脉 AS 的形态学改变明显减少、减轻, 见图 1

和表 2。

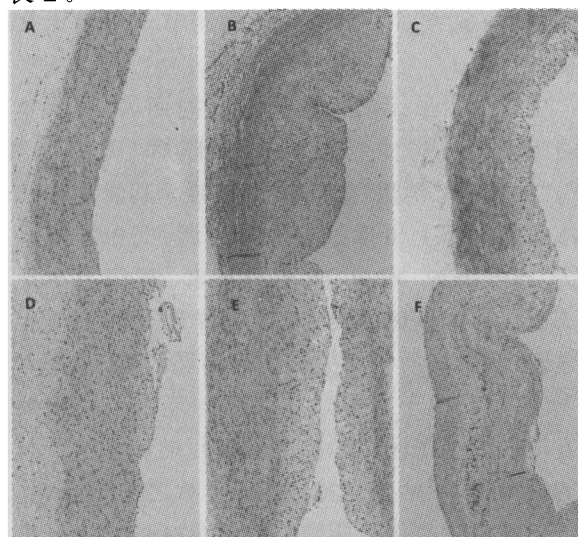


图 1 主动脉形态学改变(HE 染色, ×100)

A: 正常组; B: 模型组; C 辛伐他汀组; D: 痰瘀同治方 5 g·kg⁻¹ 剂量组; E: 痰瘀同治方 2.5 g·kg⁻¹ 剂量组; F: 痰瘀同治方 1.25 g·kg⁻¹ 剂量组。

4 讨论

PON-1 是 HDL 颗粒中的一种抗氧化酶。PON-1 的研究最初是在毒物学的研究领域, 因能水解对氧磷而得名, 其化学本质为芳香基二烷基磷酸酯酶(E. C. 3. 1. 8. 1)。PON 基因位于人类第 7 号染色体长臂(7q21.3~ 22.1), 是一个由 PON-1, PON-2, PON-3 组成的多基因家族。近年来, 研究人员对 PON-1 的抗 AS 机制、基因多态性以及活性调节进行了大量的研究。以往的研究认为 PON-1 基因多态性与 AS 存在相关性^[6], 但近年的研究证明 PON-1 活性在 AS 病变过程中较 PON-1 基因型更有预测价值^[7], 在一项前瞻性的临床研究中显示 PON-1 活性降低是冠心病独立的危险因素^[8]。PON-1 活性调节可能是防治 AS 新的切入点。有研究显示^[2], 雄性鼠 PON-1 活性较低而且在炎症期间其 PON-1 活性也降低, 致炎物质脂多糖(LPS)能进一步降低雄鼠肝脏的 PON-1 mRNA 的表达, 抗炎剂则可以使 LPS 处理过的雄鼠的 PON-1 mRNA 的水平增加。一些实验研究了降脂治疗对 PON-1 活性的影响。分别以对氧磷和乙酸苯酯为底物检测 PON-1 活性时, 氟伐他汀(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹)可降低该酶活性分别达 23.6% 和 17.4%, 而低剂量的氟伐他汀(2 mg·kg⁻¹·d⁻¹)以及两种剂量的普伐他汀均对血清 PON-1 活性无影响^[9]。Deakin^[10]等报道辛伐他汀可显著增加血清 PON-1 活性及浓度, 并通过体外提出了其可能的分子机制, 认为辛伐他汀可上

调 PON-1 基因的启动子活性, 且呈剂量依赖方式。然而, 中药复方对 PON-1 活性的调节作用尚无文献报道。

中医学中虽无动脉粥样硬化的病名, 根据本病的临床表现及病理变化, 本病可归属“痰浊”、“胸痹”、“中风”、“消渴”等病症的范畴。其发病多在年老体虚的基础上出现脏腑功能失调, 气血津液运行不畅, 产生痰浊、瘀血、气滞等病邪, 其病为本虚标实。现代研究认为, 导致动脉粥样硬化的首要因素是血脂过高, 脂质代谢失调。而高脂血症, 根据其临床表现, 可归属于中医学“痰浊”的范畴^[1]。痰瘀同治方根据传统中医对动脉粥样硬化的认识和现代研究的结果, 运用活血化瘀、祛痰通脉之法选药组方。本研究用球囊拉伤高脂喂养建立兔 AS 模型, 观察了痰瘀同治方对 AS 的干预作用。结果显示, 痰瘀同治方通过调节血脂代谢, 改善炎症状态, 保护 PON-1 活性等途径发挥抗 AS 的作用。痰瘀同治方对炎症因子的调节以及保护 PON-1 活性的机理有待进一步研究和探讨。

[参考文献]

[1] 杜立杰, 王学东, 胡大一. 炎症与动脉粥样硬化[J]. 中国心血管杂志, 2006, 11(1): 62-65.

[2] Bin Ali A, Zhang Q, Lim YK, *et al.* Expression of major HDL-associated antioxidant PON-1 is gender dependent and regulated during inflammation[J]. *Free Radical BiolMed*, 2003, 34(7): 824-829.

[3] Kumon Y, Suehiro T, Ikeda Y, Hashimoto K. Human paraoxonase 1 gene expression by HepG2 cells is down regulated by interleukin 1beta and tumor necrosis factor-alpha, but is upregulated by interleukin-6[J]. *Life Sci*, 2003, 73(22): 2807-2815.

[4] Antony K. Lau, Steven B. Leichtweis, Peter Hume, *et al.*

Probuocol Promotes Functional Reendothelialization in Balloon-Injured Rabbit Aortas[J]. *Circulation*, 2003, 22: 2030-2036.

[5] Zakaria Ahmed, Amir Ravandi, Graham F. Maguire, *et al.* Multiple Substrates for Paraoxonase 1 during Oxidation of Phosphatidylcholine by Peroxynitrite[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, 290(1): 391-396.

[6] Mackness B, Mackness MI, Arrol S, *et al.* Effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification[J]. *Febs Lett*, 1998, 423: 57-60.

[7] Mackness B, Davies GK, Turkie W, Lee E, Roberts DH, Hill E. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(9): 1451-1457.

[8] Mackness B, Durrington P, McElduff P, *et al.* Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study[J]. *Circulation*, 2003, 107: 2775-2779.

[9] Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors (statins) on tissue paraoxonase 1 and plasma platelet activating factor acetylhydrolase activities [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, 43(1): 121-127.

[10] Deakin S, Leviev I, Guernier S, James RW. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein 2[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(11): 2083-2089.

[11] 张 愨. 冠心病痰浊辩证分型与血清脂蛋白动态平衡关系的研究[J]. *中西医结合志*, 1995, 15(1): 9.