

大黄燧虫丸抗家兔动脉粥样硬化机理研究

李静莉, 刘俊田*, 苟伟, 李西宽, 刘传镐
(西安交通大学医学院, 陕西 西安 710061)

[摘要] 目的: 探讨大黄燧虫丸抗早期动脉粥样硬化(AS)的机制。方法: 采用免疫损伤合并高脂食饵的方法复制家兔早期AS模型, 检测指标包括血脂测定; 血清丙二醛(MDA)测定; 血管壁组织形态学观察。结果: 大黄燧虫丸对血脂各项指标无明显影响($P > 0.05$), 但降低血清MDA水平($P < 0.05$), 明显缩小主动脉AS斑块面积, 减少泡沫细胞层数, 减轻内膜增厚。结论: 大黄燧虫丸通过非降脂的作用机制抑制AS的形成。

[关键词] 大黄燧虫丸; 动脉粥样硬化; 血脂; 丙二醛

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2006)05-0032-03

Study of the Anti-atherosclerotic Mechanisms by Dahuang Zhechong Pill

LI Jing-li, LIU Jun-tian, GOU Wei, LI Xi-kuan, LIU Chuan-hao
(Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Shanxi Xi'an 710061, China)

[Abstract] **Aim:** To observe the anti-atherosclerotic mechanisms by Dahuang Zhechong pill. **Methods:** The atherosclerotic model was established by hypercholesterol feeding together with immune-injured endothelium in rabbits. The levels of blood lipid and MDA in the serum were determined. Histological examination was done by light microscopes. **Results:** The results showed that the level of MDA was decreased and the level of blood lipid wasn't significantly changed in Dahuang Zhechong pill-administered groups in comparison with the control group. Histological examination showed the reduced area of atherosclerotic plaque in aorta, the lightened intimal hyperplasia, decreased foam cells in drug-administered groups. **Conclusions:** Dahuang Zhechong pill can inhibit the development of early atherosclerosis by the non-lowering lipid mechanisms, including inhibition of the lipid oxidation.

[Key words] Dahuang Zhechong Pill; atherosclerosis; blood lipid; MDA

大黄燧虫丸出自汉代著名医家张仲景所著《金匱要略》, 由熟大黄、燧虫、水蛭、虻虫、蛭螯、桃仁、干漆、干地黄、芍药、黄芩、杏仁、甘草十二味药材组成, 具有疏通经络、破瘀生新、缓中补虚之功效^[1], 临床上主要用于肝炎肝硬化的治疗, 近年来也用来治疗内有瘀血症的动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS), 且

有一定的疗效。本文主要从血脂和脂质过氧化角度探讨大黄燧虫丸抗早期AS的机制。

1 材料

1.1 动物 新西兰大耳白家兔, 雄性, 体重2.2kg左右, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂与仪器 胆固醇购自天津市珠江卫生材料厂; 1%胆固醇高脂饲料由西安交通大学医学院实验动物中心提供; 牛血清白蛋白购自北京奥博星生物技术责任有限公司; MDA检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 7180型全自动生化分析仪, 日本日立公司。

1.3 药物 大黄燧虫丸, 60g/瓶, 西安正大制药有限

[收稿日期] 2005-08-22

[基金项目] 陕西省自然科学基金(No. 2003C115); 国家自然科学基金资助项目(No. 30572347)

[通讯作者] 刘俊田, Tel: (029) 82655188; E-mail: ljt@mail.xjtu.edu.cn

公司生产,批号 030505。临用前加蒸馏水分别配成 15% 30% 混悬液供使用。

2 方法

2.1 模型制备与分组 造模方法为免疫损伤血管内皮合并高脂食饵的方法^[2]。29 只雄性新西兰大耳白家兔,体重 2.2kg 左右,随机分为 4 组:正常对照组 5 只,模型对照组、大黄䟽虫丸低、高剂量组各 8 只。造模第一天除正常对照组外其余各组家兔一次性耳缘静脉注射牛血清白蛋白 250 mg·kg⁻¹,随后高脂饲料喂养。正常对照组和模型对照组给予等量的自来水,大黄䟽虫丸低、高剂量组在造模的同时每天分别给予大黄䟽虫丸 0.9g·kg⁻¹、1.8g·kg⁻¹。各组均灌胃给药,6mL·kg⁻¹,每天 1 次,连续 2 月。

2.2 血脂测定 各组动物分别于造模前、给药后 1 个月 2 个月兔耳中央动脉采血 2~4mL(每次采血前禁食 12h 以上),离心 2500 r/min × 15min 分离血清,用全自动生化分析仪检测总胆固醇(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)、载脂蛋白 AI(apo AI)、载脂蛋白 B(apo B)。

2.3 血清 MDA 测定 取所分离的血清,用 TBA 法测定丙二醛(MDA),因血清呈乳白色,故采用高度高脂血清症检测方法,实验操作参照说明书。

2.4 血管壁组织形态学观察 实验结束时,空气栓塞处死动物,迅速开胸暴露心脏,分离主动脉,切取从主动脉瓣至胸主动脉段血管,剥除外膜结缔组织,从背侧面纵行剖开血管,在滤纸上铺开主动脉条,数

码相机照相,肉眼观察血管内膜及 AS 斑块,定性描述 AS 斑块的大小;然后切取 1~2 cm 动脉组织置于 4% 的多聚甲醛溶液中,用于 HE 染色普通病理观察。

组织病理学观察包括定性和定量描述。AS 程度的定量描述以血管内膜厚度与中膜厚度的比值表示。取 HE 染色的病理切片,在 10×10 倍放大条件下,用 1/10mm 目镜测微尺测定动脉内膜及中膜厚度,并计算内膜/中膜的比值。以内膜最厚处为中心,测量该点的内膜厚度及中膜厚度,然后将动脉段等分成 5 点(包括中心点),分别测其内膜厚度及中膜厚度,分别计算每点的比值,最后计算每个动物 5 个测量点的平均比值^[3]。

2.5 统计学分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 Sigma STAT 进行数据分析,组间比较用单因素方差分析(血脂结果采用重复测量数据的方差分析法),两两比较用 SNK-*q* 检验,*P* < 0.05 认为有显著性差异。

3 结果

3.1 大黄䟽虫丸对血脂的影响 结果表明,实验前各组血脂无显著性差异。实验结束时,模型对照组 TC HDL-C LDL-C apo AI apo B 水平显著升高(*P* < 0.05);TG 水平虽也升高,但统计学无显著性差异(*P* > 0.05)。与模型对照组相比,大黄䟽虫丸组 TG apo B 水平轻度降低,apo AI 水平升高,但统计学无显著性差异(*P* > 0.05);TC LDL-C HDL-C 水平无明显变化,说明大黄䟽虫丸对 AS 模型家兔血脂无明显影响(表 1 和表 2)。

表 1 大黄䟽虫丸给药 2 个月对 AS 模型家兔血脂的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 剂量 (g/kg) | TC(mmol·L ⁻¹) | | | TG(mmol·L ⁻¹) | | | HDL-C(mmol·L ⁻¹) | | |
|-----------|---|--------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|-------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | 造模前 | 给药 1 月 | 给药 2 月 | 造模前 | 给药 1 月 | 给药 2 月 | 造模前 | 给药 1 月 | 给药 2 月 |
| 正常对照组 | 5 | — | 1.74 ± 0.41 | 1.42 ± 0.41 ²⁾ | 1.84 ± 0.41 ²⁾ | 0.96 ± 0.59 | 1.05 ± 0.20 | 1.06 ± 0.34 | 0.93 ± 0.44 | 0.56 ± 0.14 ²⁾ | 0.53 ± 0.17 ²⁾ |
| 模型对照组 | 6 | — | 2.16 ± 0.92 | 17.93 ± 0.95 | 33.84 ± 0.29 | 0.87 ± 0.80 | 0.99 ± 0.27 | 1.25 ± 0.77 | 0.68 ± 0.38 | 4.70 ± 0.58 | 7.85 ± 0.04 |
| 大黄䟽虫丸低剂量组 | 8 | 0.9 | 1.89 ± 0.57 | 20.17 ± 3.26 | 32.3 ± 4.32 | 1.76 ± 0.28 | 1.27 ± 0.41 | 0.96 ± 0.30 | 0.64 ± 0.20 | 5.87 ± 1.08 ¹⁾ | 7.82 ± 0.10 |
| 大黄䟽虫丸高剂量组 | 6 | 1.8 | 2.26 ± 1.30 | 18.42 ± 3.01 | 33.74 ± 0.48 | 0.84 ± 0.32 | 1.55 ± 0.99 | 0.85 ± 0.33 | 0.98 ± 0.77 | 4.85 ± 1.0 | 7.88 ± 0.04 |

注:与模型对照组比较 ¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(下同)

表 2 大黄䟽虫丸给药 2 个月对 AS 模型家兔血脂的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 剂量 (g/kg) | LDL-C(mmol·L ⁻¹) | | | apo AI(g·L ⁻¹) | | | apo B(g·L ⁻¹) | | |
|-----------|---|--------------|------------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | 造模前 | 给药 1 月 | 给药 2 月 | 造模前 | 给药 1 月 | 给药 2 月 | 造模前 | 给药 1 月 | 给药 2 月 |
| 正常对照组 | 5 | — | 1.53 ± 0.87 | 0.69 ± 0.16 ²⁾ | 1.03 ± 0.32 ²⁾ | 0.33 ± 0.08 | 0.34 ± 0.15 ²⁾ | 0.86 ± 0.18 ¹⁾ | 0.17 ± 0.09 | 0.24 ± 0.06 ²⁾ | 0.37 ± 0.11 ¹⁾ |
| 模型对照组 | 6 | — | 1.23 ± 0.68 | 9.34 ± 0.85 | 17.12 ± 0.86 | 0.25 ± 0.13 | 0.76 ± 0.13 | 1.05 ± 0.03 | 0.16 ± 0.09 | 0.41 ± 0.09 | 0.62 ± 0.22 |
| 大黄䟽虫丸低剂量组 | 8 | 0.9 | 0.84 ± 0.33 | 10.88 ± 1.54 ¹⁾ | 16.2 ± 3.23 | 0.46 ± 0.22 | 0.85 ± 0.22 | 1.17 ± 0.21 | 0.29 ± 0.19 | 0.34 ± 0.10 | 0.59 ± 0.11 |
| 大黄䟽虫丸低剂量组 | 6 | 1.8 | 0.94 ± 0.72 | 9.73 ± 1.88 | 17.63 ± 0.19 | 0.35 ± 0.32 | 0.81 ± 0.23 | 1.16 ± 0.20 | 0.19 ± 0.15 | 0.29 ± 0.06 ¹⁾ | 0.57 ± 0.16 |

3.2 大黄燧虫丸对血清 MDA 的影响 结果表明,模型对照组血清 MDA 水平显著升高($P < 0.01$),大黄燧虫丸组血清 MDA 水平显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),说明大黄燧虫丸降低 AS 模型家兔血清 MDA 水平(表 3)。

表 3 大黄燧虫丸给药 2 个月对 AS 模型家兔血清 MDA 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 剂量(g/kg) | MDA(nmol·ml ⁻¹) |
|-----------|---|----------|-----------------------------|
| 正常对照组 | 5 | — | 9.96 ± 1.42 ²⁾ |
| 模型对照组 | 6 | — | 16.30 ± 2.43 |
| 大黄燧虫丸低剂量组 | 8 | 0.9 | 13.65 ± 2.20 ¹⁾ |
| 大黄燧虫丸高剂量组 | 6 | 1.8 | 12.18 ± 1.40 ²⁾ |

3.3 大黄燧虫丸对血管壁组织形态学的影响

3.3.1 大体标本观察 正常对照组血管内膜光滑,未见任何斑点和条纹;模型对照组主动脉管壁有大量黄白色脂样物向管腔凸出,并连成片状;大黄燧虫丸组内膜表面有局限性的斑块隆起,但程度明显轻于模型对照组。

3.3.2 普通病理观察 正常对照组内皮细胞连续完整而光滑,内弹力膜完整,表面未见炎细胞黏附。模型对照组内膜增厚突入管腔,呈脂纹期和纤维斑块期改变,内膜中大量泡沫细胞聚集,病灶中可见数量不等的 VSMC、炎细胞、蛋白聚糖、胶原纤维等;中膜厚薄不均,弹力纤维断裂、消失或紊乱。大黄燧虫丸组多为脂纹期病变,内膜呈灶性增厚,泡沫细胞层数明显低于模型对照组,中膜平滑肌厚度均匀,走行无明显异常,部分弹力纤维波纹断裂或消失。

表 4 结果表明,模型对照组血管内膜/中膜厚度比值明显增大($P < 0.01$),大黄燧虫丸组血管内膜/中膜厚度比值减小,其中大剂量组有显著性差异($P < 0.05$),说明大黄燧虫丸可使 AS 模型家兔血管内膜/中膜厚度比值减小,逆转血管壁的重构(表 4)。

表 4 大黄燧虫丸对 AS 模型家兔血管内膜/中膜厚度比值的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 剂量(g/kg) | 内膜/中膜比值 |
|-----------|---|----------|-----------------------------|
| 正常对照组 | 5 | — | 0.012 ± 0.003 ²⁾ |
| 模型对照组 | 6 | — | 0.626 ± 0.142 |
| 大黄燧虫丸低剂量组 | 8 | 0.9 | 0.446 ± 0.180 |
| 大黄燧虫丸高剂量组 | 6 | 1.8 | 0.424 ± 0.123 ¹⁾ |

4 讨论

脂质代谢异常与 AS 密切相关,其中 TC、LDL-C

升高和 HDL-C 降低已被确认为 AS 发生的独立危险因素。apo AI 主要存在 HDL 中,apo B 主要存在极低密度脂蛋白(VLDL)、LDL-C、乳糜微粒(CM)中,所以 apo AI 的降低和 apo B 的升高都与 AS 的发展高度相关^[4]。本实验中模型组 TC、LDL-C、HDL-C、apo AI、apo B 均显著升高,而作为保护因素的 HDL-C、apoAI 之所以也升高,是由于血中 TC 升高,所以携带胆固醇的 HDL-C 和载脂蛋白 apo AI 也代偿性的升高。大黄燧虫丸给药组虽可降低 TG、apo B,升高 apoAI,但统计学无显著性差异,且对 TC、LDL-C、HDL-C 无明显影响。这与大黄燧虫丸降低 AS 患者血脂不完全一致,可能与 AS 患者在接受治疗时采用低脂饮食有关,确切原因尚待进一步研究。但是从大体标本来看,大黄燧虫丸可使 AS 模型家兔主动脉 AS 斑块面积减小,脂质沉着减轻,具有抗 AS 作用,提示该药具有非降脂的其他抗 AS 机制。

高脂本身不足以促发 AS,脂蛋白被氧化修饰后才具有明显的致病作用,尤其是 LDL 被氧化为 ox-LDL。ox-LDL 具有细胞毒作用,损伤内皮细胞,刺激内皮细胞释放趋化因子、黏附因子等,刺激 VSMC 增殖和迁移。LDL 中含有大量的不饱和脂肪酸,不饱和脂肪酸在氧自由基作用下产生醛类化合物如 MDA 等脂质过氧化产物。所以血清 MDA 水平高低可以反映体内脂质过氧化水平,间接地反映细胞受损伤的程度^[5]。大黄燧虫丸可以降低 AS 模型家兔血清 MDA 水平,减少体内的脂质过氧化,延缓 AS 的形成,提示抑制脂质过氧化可能是其抗 AS 的机制之一。

[参考文献]

[1] 闫俊杰,陈信义. 大黄燧虫丸实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2000, 6(5): 60-61.

[2] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 1189-1206.

[3] 张均田. 现代药理实验方法[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 2000, 1268.

[4] 陈起萱,凌文华,马静. 黑米和红米对兔主动脉脂质斑块面积和血脂的影响[J]. 卫生研究, 2000, 29(3): 170-171.

[5] 杨永宗. 动脉粥样硬化性心血管病基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2004. 600.