

四逆汤对兔实验性动脉粥样硬化斑块形成及血脂的影响

黑子清, 吴伟康, 黄河清, 罗汉川, 孙惠兰, 谭红梅

(中山大学中山医学院中西医结合研究所, 广东 广州 510089)

摘要: 目的: 探讨四逆汤抗兔实验性动脉粥样硬化形成的作用。方法: 将 32 只新西兰大白兔随机分为四组: 正常对照组、模型组、四逆汤高剂量组、四逆汤低剂量组。分别给予普通饲料(正常对照组)和胆固醇高脂饮食(其它三组)喂养; 四逆汤组采用预防性给药, 实验结束后, 分别观察主动脉病理、主动脉粥样硬化斑块面积、血脂及血浆丙二醛含量。结果: 四逆汤可显著缩小主动脉斑块面积与厚度; 降低血清 TC、TG、LDL-C、apoB, 降低丙二醛的含量。四逆汤低剂量组效果优于四逆汤高剂量组。结论: 四逆汤能调节脂代谢, 具有一定的抗动脉粥样硬化作用。

关键词: 动脉粥样硬化; 四逆汤; 血脂

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B **文章编号:** 1005-9903(2003)02-0027-03

收稿日期: 2002-06-25

基金项目: 国家自然科学基金资助课题, 项目编号: [2000] 编号: 30070930

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是最常见的缺血性心脑血管疾病,严重危害人类健康。“氧化损伤学说”是动脉粥样硬化形成的重动脉粥样硬化的重要机理^[1]。我们的研究表明;传统复方中药四逆汤具有扩张冠脉血管,对心肌缺血和缺血再灌注具有良好的抗氧化损伤作用^[2-3]。据此,为进一步研究该方对心血管的作用,我们复制家兔AS模型,通过四逆汤预防用药,观察其抗动脉粥样硬化形成的作用,为拓展四逆汤的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康新西兰大耳白兔32只,体重1.5~2kg,雌雄不拘,5~6月龄,购自中山医科大学实验动物中心。

1.2 动物分组 将实验兔随机分为4组:正常对照组、模型组、四逆汤低剂量组和四逆汤高剂量组。

1.3 药物 四逆汤(SiNi Decoction)由附子(*Radix Aconiti praeparata*)、干姜(*Rhizomo*)、生甘草(*Radix Glycyrrhizae*)组成,由广东一方制药厂提供颗粒剂,按剂量比为5:3:2配制。

2 实验方法与观察指标

2.1 实验方法 正常对照组喂饲基础饲料;模型组[model group]给予1%胆固醇加5%猪油饲料喂饲;按人与动物体表面积比计算,四逆汤低剂量组[Small dose group SiNi Decoction, SD(S)],每兔每天每公斤体重给予含2.1g生药的四逆汤颗粒剂,混合于与模型组同条件的高脂饲料中喂饲;四逆汤高剂量组[High dose group SiNi Decoction, SD(H)],每兔每天每公斤体重给予含4.2g生药的四逆汤颗粒剂,混合于与模型组同条件的高脂饲料中喂饲;后三组均每日先将造模药物或造模药物与四逆汤颗粒剂先拌于约50g基础饲料中喂饲,待食完后再补足基础饲料。各动物给食一般每日限制在135~150g。分笼饲养,自由饮水。造模及预防性用药10周。实验满10周后,各组动物自耳静脉取血,依据所测指标作不同的处理,分离血浆。用气栓法处死动物,从主动脉弓起始部至腹主动脉骼前分叉处取下主动脉,清除外膜脂肪组织。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 主动脉斑块面积计算 主动脉沿背部正中线剪开,用生理盐水清洗,主动脉平铺黑色布板上摄像,用JVC彩色图像摄录输入仪和德国Kontron Ibas 2.5全自动图象分析仪,根据数字灰度图象,测定主动脉脂质斑块面积百分比。

2.2.2 光镜标本制作及观察 主动脉弓起始部5mm处取材0.5cm左右,用含0.1% DEPC的4%多聚甲醛固定标本,石蜡切片,石蜡切片经HE染色,用德国ZEISS Axiotron 研究显微镜,40倍下观病理片,取斑块最厚处,信号用JVC彩色图像摄录输入德国Kontron Ibas 2.5全自动图象分析仪计算主动脉血管内膜和中膜斑块面积、内膜斑块面积与中膜斑块面积比、内膜的厚度。

2.2.3 血脂的检测 血清总TC与血清TG测定采用酶动力学法,血清HDL-C测定采用一步法,血清低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoproteins-cholesterol, LDL-C)用公式推算[$TC - (0.54 \times TG + HDL-C)$],以上结果均用mmol/L表示;血清apoA与apoB测定采用免疫透射比浊法,结果用g/L表示。

2.2.4 血清丙二醛含量的测量 按硫代巴比妥(TBA法)测量。

2.3 统计学处理 应用WIN98中的SPSS8.0软件进行统计分析。具体方法为:完全随机分组的多组均数比较的单因素方差分析(LSD)法,直线回归相关分析等。数据结果用均数加标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

3 结果

3.1 主动脉病理改变 从表1看出,主动脉斑块面积百分比,四逆汤制剂组均明显小于高脂模型组($P < 0.05$)。四逆汤小剂量组小于四逆汤高剂量组(见表1)。模型组8只家兔中有3只病变严重,广泛累及主动脉各段内膜;四逆汤制剂高剂量组有1只病变程度严重,2只病变程度中等,其余病变较轻;四逆汤低剂量组有6只病变程度较轻,2只病变中等。

主动脉光学显微镜观察:主动脉内膜斑块厚度,四逆汤低剂量组明显低于模型组和四逆汤高剂量组, ($P < 0.05$),而四逆汤高剂量组虽低于模型组,但无统计学差异($P > 0.05$);主动脉内膜斑块面积/中膜面积比值,四逆汤制剂均明显低于模型组($P < 0.01$)。四逆汤低剂量组低于四逆汤高剂量组。见表1。

表1 主动脉病理改变比较($\bar{x} \pm s; n = 8$)

组别	主动脉斑块面积比(%)	内膜斑块厚度(Hm)	内膜斑块面积(Hm ²)	内膜斑块面积/中膜斑块面积比
模型组	34.79 ± 9.71	30.86 ± 13.59	3093.16 ± 873.62	0.72 ± 0.39
四逆汤(低)	9.32 ± 5.41 ^c	8.37 ± 6.13 ^b	867.67 ± 636.71 ^c	0.15 ± 0.12 ^c
四逆汤(高)	18.55 ± 9.53 ^{cd}	24.83 ± 28.74 ^d	1776.61 ± 725.25 ^{bc}	0.28 ± 0.14 ^{ce}

注:与模型组相比 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$; 四逆汤高剂量组与四逆汤低剂量组相比 d: $P < 0.05$, e: $P < 0.01$

从病变特点看,模型组HE染色示脂质斑块弥

漫且较厚,泡沫细胞多达10余层,四逆汤制剂组的内膜斑块多较薄且局限,而正常对照组主动脉内膜光滑,管腔较大。

3.2 血脂的变化 模型组和四逆汤组血清总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白A和载脂蛋白B均显著高于对照组($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$),甘油三酯一定程度增高($P < 0.05$)。四逆汤低剂量组和四逆汤高剂量组与模型组相比,四逆汤两组总胆固醇、载脂蛋白A和B水平低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.05$);与四逆汤大剂量组相比,四逆汤小剂量组血脂指标多数低,其中TC、TG有显著性差异。($P < 0.05$)。

表2 四逆汤对血清TC、TG、HDL-C、LDL-C、apoA、apoB的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	对照组	模型组	四逆汤(高)	四逆汤(低)
TC (mmol/L)	1.66 ± 0.88	41.98 ± 12.10 ^f	33.07 ± 12.10 ^{cd}	24.76 ± 15.23 ^{cde}
TG (mmol/L)	0.76 ± 0.33	1.31 ± 0.47 ^a	1.89 ± 1.01 ^a	1.34 ± 0.88 ^{bc}
HDL-C (mmol/L)	0.61 ± 0.25	1.78 ± 0.43 ^c	2.07 ± 0.63 ^c	1.61 ± 0.78 ^b
LDL-C (mmol/L)	0.63 ± 0.56	35.80 ± 13.38 ^c	29.25 ± 11.09 ^c	22.2 ± 14.55 ^{cde}
LDL/HDL	0.89 ± 0.71	20.5 ± 6.29 ^c	12.88 ± 6.41 ^{cd}	13.88 ± 2.42 ^{cd}
ApoA (g/L)	0.012 ± 0.56	0.78 ± 0.38 ^c	0.62 ± 0.57 ^b	0.32 ± 0.39 ^{ac}
ApoB (g/L)	0.063 ± 0.02	1.66 ± 0.85 ^c	0.77 ± 0.74 ^{bd}	1.13 ± 0.83 ^{ad}

注:与对照组相比 a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, c: $P < 0.001$;与模型组相比 d: $P < 0.05$, e: $P < 0.01$;四逆汤高剂量组与四逆汤低剂量组相比 $P < 0.05$

3.3 血清MDA含量 对血清丙二醛含量,对照组为 4.39 ± 0.60 nmol/ml,模型组为 6.58 ± 1.09 nmol/ml,四逆汤大剂量组为 5.33 ± 0.60 nmol/ml,四逆汤小剂量组为 4.44 ± 0.42 nmol。与对照组相比,模型组与四逆汤组均有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),四逆汤大剂量组低于模型组而高于四逆汤小剂量组($P < 0.05$)。对模型组和四逆汤两组的主动脉粥样斑块面积与血清MDA含量进行相关分析后发现:模型组MDA与斑块面积呈正相关($r = 0.73, P < 0.05$)。四逆汤大剂组MDA与斑块面积呈正相关($r = 0.885, P < 0.01$);四逆汤小剂量组MDA与斑块面积呈正相关($r = 0.741, P < 0.05$)。

4 讨论

近几年的二级干预试验表明:降低血浆胆固醇及低密度脂蛋白(LDL)水平,能明显减缓动脉粥样斑块的形成^[4,5]。本实验显示:高胆固醇饲料可导致家兔产生严重的AS;四逆汤预防性用药能够显著减

少家兔实验性主动脉内膜的脂质斑块面积。我们的实验结果还可看出,四逆汤组的血浆中TC、TG、LDL-C、apoB水平和LDL/HDL比值比与模型组低,提示四逆汤能够减轻高脂饮食脂代谢中AS的危害因子,从而产生良好的抗动脉粥样硬化作用。

本研究结发现,四逆汤抗动脉粥样硬化并未显示量-效关系,四逆汤小剂量组优于四逆汤大剂量组。从病理学结果来看,四逆汤小剂量组尚处于AS粥样硬化形成的早期阶段,表现为斑块内膜薄,泡沫细胞层次少。从血脂结果来看,四逆汤小剂量组比四逆汤大剂量组降低TC、TG和LDL更明显,从而更明显地减轻血脂中危险因素对血管的损害作用。这也可能是四逆汤低剂量效果更优的原因。

由于高血脂的作用,体内氧自由基的产生增加,可导致内皮损伤,血浆成份易穿透内皮而沉积于内皮下。吴伟康等研究发现四逆汤具有良好的抗脂质过氧化作用,具体表现:通过体外研究证实四逆汤清除氧自由基及抑制脂质过氧化反应^[2];在体内实验证实,四逆汤能够提高血浆和组织SOD活性,降低MDA含量^[3]。本实验结果证实:MDA的变化与动脉粥样斑块面积变化呈正相关,四逆汤能够降低高脂胆固醇喂养兔血浆MDA含量,四逆汤低剂量组降低MDA作用更好,因此,可以认为抗脂质过氧化损伤可能是四逆汤抗AS硬化的主要机制之一。

参考文献:

- [1] Edelman ER. Wessel size, Antioxidants and resterosis, never toos mall, not too little, but often too late [J]. Circulation, 1998, 97: 416-420.
- [2] 吴伟康,侯灿,罗汉川,等. 四逆汤清除氧自由基及抑制心肌脂质过氧化反应的体外实验[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(11): 68-69.
- [3] 谢全锦,吴伟康,侯灿. 实验性心肌缺血时四逆汤对铜-锌超氧化物歧化酶基因表达的调节[J]. 国际心血管杂志. 汉文版, 1999(1): 64-65.
- [4] Third Reports of Ncep. Expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adult [M]. NIH Publication No, 2001, 1: 3670.
- [5] 董和. 补肾降脂药物作用的观察[J]. 中西医结合杂志, 1991, 11(1): 25-27.