

四妙勇安汤对动脉粥样硬化小鼠动脉血管斑块外膜滋养血管通透性的影响

漆仲文¹, 李萌¹, 朱科², 张军平^{1*}

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193; 2. 郑州市中医院, 郑州 450000)

[摘要] **目的:**观察四妙勇安汤对动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)易损斑块病理形态及外膜滋养血管(vasa vasorum, VV)通透性的影响,并以VV为靶点探讨其干预机制。**方法:**采用健康雄性ApoE^{-/-}小鼠,随机分为模型组、四妙勇安汤组(11.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹)和辛伐他汀组(2.6 mg·kg⁻¹·d⁻¹),给予添加1.1% L-蛋氨酸的高脂饲料喂养;以C57BL/6小鼠作为正常组,喂养8周后进行模型评价,在模型成功基础上,持续药物干预8周,采用油红O染色观察小鼠主动脉的病理形态变化;通过免疫组化染色观察主动脉根部斑块外膜基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9),基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1)蛋白的表达情况。**结果:**油红O染色结果显示,与正常组比较,模型组主动脉血管内壁斑块面积显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,辛伐他汀组主动脉内壁斑块面积显著减少($P < 0.01$);四妙勇安汤组主动脉内壁斑块面积明显减少($P < 0.05$)。免疫组化染色结果显示,与正常组比较,模型组小鼠主动脉外膜MMP-9阳性表达面积明显增大($P < 0.01$);与模型组比较,辛伐他汀组与四妙勇安汤组MMP-9阳性表达明显减小($P < 0.01$);与辛伐他汀组比较,四妙勇安汤组MMP-9阳性表达明显减小($P < 0.01$)。**结论:**四妙勇安汤能减轻小鼠主动脉斑块面积,通过调节MMP-9、TIMP-1的表达,降低斑块外膜VV通透性,稳定易损斑块。

[关键词] 四妙勇安汤; 动脉粥样硬化; 易损斑块; 滋养血管; 通透性

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)11-0024-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190904

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190117.1416.022.html>

[网络出版时间] 2019-01-18 11:30

Effect of Simiao Yongan Tang on Permeability of Vasa Vasorum of Atherosclerotic Plaque

QI Zhong-wen¹, LI Meng¹, ZHU Ke², ZHANG Jun-ping^{1*}

(1. *The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;*
2. *Zhengzhou Chinese Medicine Hospital, Zhengzhou 450000, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Simiao Yongan Tang on the pathologic morphology of atherosclerosis (AS) vulnerable plaque and the permeability of vasa vasorum (VV), and to explore its intervention mechanism with VV as the target. **Method:** Healthy male ApoE^{-/-} mice were randomly divided into model group, Simiao Yongan Tang group (11.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹) and simvastatin group (2.6 mg·kg⁻¹·d⁻¹). High-fat diet supplemented with 1.1% L-methionine was given to induce the animal model, while C57BL/6 mice were used as the control group. The model was evaluated after 8 weeks of feeding. After successful modeling, continued drug intervention was given for 8 weeks, and the pathological changes of the mouse aorta were observed by oil red O staining. The expression levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) proteins in the outer membrane of aortic root plaques were observed by immunohistochemical staining.

[收稿日期] 20180924(008)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(818051462);第二批国家“万人计划”百千万工程领军人才项目(20160621)

[第一作者] 漆仲文,在读博士,从事中医药心血管病研究,E-mail:13820596855@163.com

[通信作者] *张军平,博士生导师,从事中医药治疗心血管病研究,Tel:022-27432016,E-mail:tjzhtcm@163.com

Result: The results of oil red O staining showed that as compared with the control group, the plaque area of the aortic wall was significantly increased in the model group ($P < 0.01$). As compared with the model group, the plaque area of the aorta was significantly decreased in the simvastatin group ($P < 0.01$), and the area of plaque in the aortic wall was reduced in Simiao Yongan Tang group ($P < 0.05$). The results of immunohistochemical staining showed that as compared with the normal control group, the positive expression of MMP-9 in the aortic adventitia was significantly increased in the model group ($P < 0.01$). As compared with the model group, the positive expression of MMP-9 was significantly decreased in simvastatin group and Simiao Yongan Tang group ($P < 0.01$). As compared with the simvastatin group, the positive expression of MMP-9 was significantly decreased in Simiao Yongan Tang group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Simiao Yongan Tang can reduce the area of mouse aortic plaque, reduce the VV permeability of the outer plaque by regulating the expression of MMP-9 and TIMP-1, and stabilize the vulnerable plaque.

[Key words] Simiao Yongan Tang; atherosclerosis; vulnerable plaque; vasa vasorum; permeability

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)易损斑块的破裂是导致急性冠脉综合征发生的根本原因,因此,如何稳定易损斑块而减少其破裂,成为 AS 治疗的重点^[1]。由于斑块外膜新生血管结构的不完整性,脆性大、渗漏性高,为各种炎性因子进入斑块内提供通道,加重了斑块的不稳定性,因此抑制炎性因子的渗入、调节新生血管通透性及促进外膜滋养血管(vasa vasorum, VV)成熟化能够增强斑块的稳定性,起到治疗 AS 的作用。

四妙勇安汤最早见于《华佗神医秘传》,当为治疗脱疽之妙方,方中金银花清热解毒,玄参清热凉血,当归活血养血,甘草片调和诸药,4 味中药具有清养兼顾、毒瘀并驱的功效。后世医家对该方进行深入挖掘,扩大了其临床运用范围,主要用于周围血管疾病、心血管疾病、脑血管疾病及一些免疫性疾病。前期研究发现四妙勇安汤具有影响平滑肌细胞的迁移、抑制斑块内新生血管、抑制炎症因子释放、抗氧化应激等作用^[2-5],达到稳定斑块的效果。本研究基于以上基础,结合相关中医理论,以载脂蛋白 E 敲除(ApoE^{-/-})小鼠为研究对象建立 AS 模型,以四妙勇安汤为干预手段,观察四妙勇安汤对外膜 VV 通透性的影响,并探讨其可能起效机制,为中医药防治 AS 提供理论及实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康 7~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠(伦理号 TYLL2017 [K] 字 015), SPF 级,体质量(23.12 ± 1.18) g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001;健康 7~8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠(伦理号 TYLL2017 [K] 字 015), SPF 级,体质量(22.97 ± 1.35) g;购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号 SCXK(京)

2014-0004,室温保持 22~24 ℃,相对湿度 50%,12 h 交替照明,饮水不限,自由摄食,适应性喂养 1 周。

1.2 药物与试剂 四妙勇安汤(由金银花、玄参、当归、甘草片按照 3:3:2:1 提取制备冻干粉,购于天津中医药大学第一附属医院,所有药材均经天津中医药大学第一附属医院副主任药师刘芳鉴定均为正品);辛伐他汀片(舒降之,杭州默沙东制药有限公司,批号 H20130146);L-蛋氨酸(美国 Sigma 公司,批号 M5308);饱和油红 O 染色剂(北京索莱宝科技有限公司,批号 G1260);DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZLI-9017);即用型 SABC-POD[兔免疫球蛋白 G(IgG)]试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号);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)兔多克隆抗体(北京博奥森生物科技有限公司,批号分别为 bs-4593R, bs-0415R);山羊抗兔 IgG H&L (Alexa Fluor® 647)(英国 Abcam 公司,批号 ab150779)。

1.3 仪器 CM1900 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);BH-2 型光学显微镜, SZX7 型体视显微镜(日本 Olympus 公司);JA1003 型电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 将雄性 ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、辛伐他汀组、四妙勇安汤组,每组 10 只,共 30 只,均以添加 1.1% L-蛋氨酸的高脂饲料喂养^[6];以 10 只 C57BL/6 小鼠作为正常组,普通饲料喂养。喂养 8 周后,辛伐他汀以 2.6 mg·kg⁻¹·d⁻¹,四妙勇安汤以 11.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 剂量灌胃给药,其他 2 组给予相同体积的蒸馏水灌胃。辛伐他汀、四

妙勇安汤的给药剂量参考徐叔云教授等^[7]主编的《药理实验方法学》，连续给药 8 周。

2.2 标本采集及处理 给药 8 周后取材，取材前禁食 12 h。采用乙醚吸入麻醉，轻压眼部皮肤，使眼球充血突出，摘取眼球取血，随后采用脱颈椎法处死小鼠。迅速打开胸腔，暴露心脏，由心尖部灌注磷酸盐缓冲液 (PBS)，钝性分离主动脉，取主动脉根部连带部分心肌组织置于 4% 中性甲醛固定液中固定，进行免疫组织化学染色。取完整主动脉置于 4% 中性甲醛固定液中固定，用于油红 O 染色。取主动脉组织并称质量后迅速置于液氮中冻存备用。

2.3 油红 O 染色观察主动脉斑块的分布情况 在体镜下观察，剔除主动脉外多余的组织，并用显微剪纵向剪开主动脉，10% 中性甲醛固定 24 h，染色前放置恒温箱 3 min，染色后蒸馏水充分洗涤，60% 异丙醇浸洗 2 min，油红 O 染液染色 20 min，充分浸染血管内膜，60% 异丙醇再次浸洗至未有脂质沉积的血管壁变为乳白色，蒸馏水清洗，观显微镜下观察采集图像，在 400 倍光镜视野下，应用 Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件进行分析，测量主动脉斑块面积。

2.4 免疫组化法检测小鼠主动脉外膜 MMP-9, TIMP-1 的表达情况 石蜡切片脱蜡，用乙醇梯度脱水，蒸馏水洗 3 min，EDTA 抗原修复液，高压热修复 5 min，自然冷却至室温，PBS 清洗 3 次，每次 5 min，3% 过氧化氢孵育 10 min，PBS 清洗 3 次，每次 5 min，滴加 5% BSA 封闭液 30 min，滴加一抗工作液 (MMP-9 按 1:600 稀释;TIMP-1 按 1:1 000 稀释)，湿盒中 4 ℃ 冰箱孵育过夜，PBS 清洗 3 次，每次 5 min，滴加二抗，DAB 显色，苏木素染液复染，梯度乙醇脱水、二甲苯透明，中性树脂封片。显微镜下观察采集图像，并对图像进行分析：在 400 倍光镜视野下，随机选取 5 个高倍视野斑块区，采用 Image-Pro Plus 6.0 专业图像分析软件进行分析，计算阳性表达面积与主动脉外膜面积的百分比，并计算其平均值。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计软件，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组比较采用单因素方差分析及 LSD 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 ApoE^{-/-} 小鼠斑块病理形态影响 正常组主动脉呈乳白色，内膜平整光滑，未见脂质沉积。与正常组比较，模型组主动脉内壁可见大面积连续呈片状的红色粥样斑块，主要集中在主动脉弓部和腹

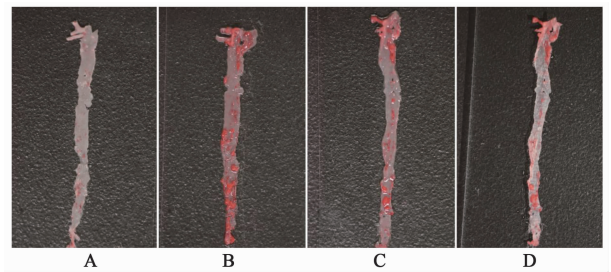
主动脉部，主动脉血管内壁斑块面积显著增加 ($P < 0.01$)。与模型组比较，辛伐他汀组仅见散在的红色粥样斑块，主动脉内壁斑块面积显著减少 ($P < 0.01$)；四妙勇安汤组可见少量红色粥样斑块，主动脉内壁斑块面积减少 ($P < 0.05$)。见表 1，图 1。

表 1 四妙勇安汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉内壁斑块面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of Simiao Yongan Tang on plaque area of ApoE^{-/-} mice aortic inner wall ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	主动脉内壁斑块面积/%
正常	-	0
模型	-	31.01 ± 4.72 ¹⁾
辛伐他汀	2.6	20.35 ± 3.11 ³⁾
四妙勇安汤	11.7	22.03 ± 5.19 ²⁾

注：与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$ ；与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ ，³⁾ $P < 0.01$ 。



A. 正常组；B. 模型组；C. 辛伐他汀组；D. 四妙勇安汤 (图 2, 3 同)

图 1 四妙勇安汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉斑块大体油红 O 染色的影响

Fig. 1 Effect of Simiao Yongan Tang on oil red O staining of ApoE^{-/-} mice aortic plaque

3.2 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉外膜 VV 通透性的影响

3.2.1 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉外膜 MMP-9 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠主动脉外膜 MMP-9 阳性表达面积显著增大 ($P < 0.01$)；与模型组比较，辛伐他汀组与四妙勇安汤组 MMP-9 阳性表达显著减小 ($P < 0.01$)；与辛伐他汀组比较，四妙勇安汤组 MMP-9 阳性表达显著减小 ($P < 0.01$)。见表 2，图 2。

3.2.2 对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉外膜 TIMP-1 蛋白表达的影响 与正常组比较，模型组小鼠主动脉外膜 TIMP-1 阳性表达面积显著增大 ($P < 0.01$)；与模型组比较，辛伐他汀组与四妙勇安汤组 TIMP-1 阳性表达显著增大 ($P < 0.01$)；与辛伐他汀组比较，四妙勇安汤组 TIMP-1 阳性表达显著增大 ($P < 0.01$)。见表 3，图 3。

表 2 四妙勇安汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉外膜 MMP-9 的阳性表达面积影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of Simiao Yongan Tang on positive expression area of MMP-9 in aortic adventitia of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	MMP-9/%
正常	-	14.65 ± 0.27
模型	-	24.55 ± 0.42 ¹⁾
辛伐他汀	2.6	2.65 ± 0.10 ²⁾
四妙勇安汤	11.7	1.70 ± 0.11 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与辛伐他汀组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

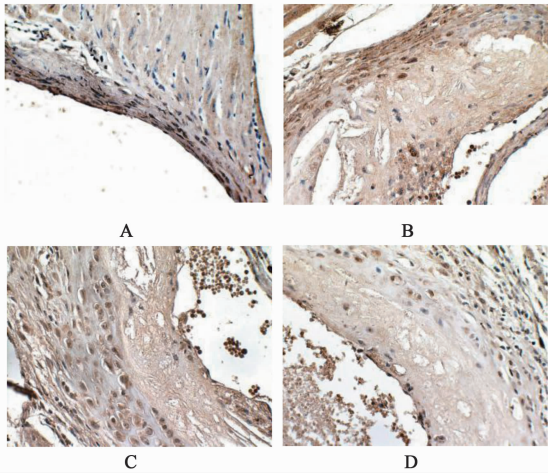


图 2 四妙勇安汤对 ApoE^{-/-} 小鼠滋养血管 MMP-9 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of Simiao Yongan Tang on positive expression of MMP-9 in aortic adventitia of ApoE^{-/-} mice (IHC, ×400)

表 3 四妙勇安汤对 ApoE^{-/-} 小鼠主动脉外膜 TIMP-1 的阳性表达面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of Simiao Yongan Tang on positive expression area of TIMP-1 in aortic adventitia of ApoE^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TIMP-1/%
正常	-	3.08 ± 0.18
模型	-	3.55 ± 0.29 ¹⁾
辛伐他汀	2.6	9.47 ± 0.17 ²⁾
四妙勇安汤	11.7	12.55 ± 0.51 ^{2,3)}

4 讨论

滋养血管在 AS 的病理发展过程中扮演着重要角色。滋养血管主要是包绕在动脉血管外膜的微小血管网络,可以为血管壁提供氧气和营养物质,也能带走其产生的代谢废物,维持管壁的新陈代谢及能量均衡^[8]。斑块内的滋养血管往往都属于病理性新生血管,其发育并不完善,血管壁结构不成熟,仅

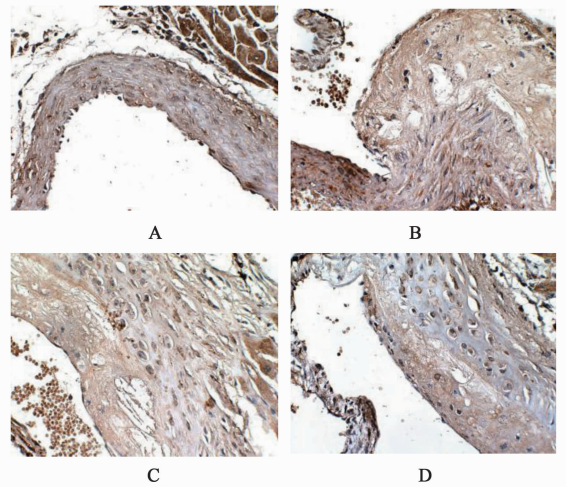


图 3 四妙勇安汤对 ApoE^{-/-} 小鼠滋养血管 TIMP-1 表达的影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 3 Effect of Simiao Yongan Tang on positive expression area of TIMP-1 in aortic adventitia of ApoE^{-/-} mice (IHC, ×400)

有内皮细胞组成,具有高的通透性,成为炎症因子、脂质成分的通道,容易引起易损斑块破裂^[9]。

基质金属蛋白酶 (MMPs) 在病理状态下随着其表达上调,细胞外基质会被降解,使斑块处于易损状态^[10],基质金属蛋白酶抑制剂 (TIMPs) 是正常体内存在的 MMPs 的特异性抑制剂,通过氨基端功能区的半胱氨酸残基与活化的 MMPs 锌离子活性中心相结合,在一定结合范围内形成 MMP-TIMP 复合物,从而阻断 MMPs 与底物的结合^[11],MMPs 及其抑制剂在细胞外基质 (ECM) 降解与血管基底膜通透性改变方面,发挥着重要作用^[12-13]。MMPs 降解的 ECM 不仅是与血管新生、血管基底膜构成相关,而且在新生血管通透性以及血管成熟化方面至关重要^[14]。此外,这些被 MMPs 降解的新生 VV 由于高渗透性,促使炎症介质、脂质成分等进入斑块内,加重脂质核心增大、纤维帽变薄,促进了 AS 的进程^[15-16]。因此,这些高通透性的新生血管成为脂质和大量炎症介质进入斑块内部的途径,激活炎症级联反应,使斑块易于破裂。

由于斑块外膜新生血管结构的不完整性,脆性大、渗漏性高,为各种炎症因子进入斑块内提供通道,导致易损斑块的破裂。因此,本实验探讨四妙勇安汤是否能改善主动脉外膜新生血管通透性,进而稳定易损斑块。本研究结果表明,四妙勇安汤能够显著降低主动脉外膜新生滋养血管 MMP-9 的表达,同时升高外膜 TIMP-1 的表达,进而降低新生血管的通透性,抑制炎症因子等生物活性物质进入主动脉斑块,发挥稳定斑块的作用,且其作用明显优于辛伐

他汀。也就是说四妙勇安汤能调节 MMP-9/TIMP-1,通过降低 MMP-9 的表达,提高 MMP-9 抑制剂 TIMP-1 在主动脉外膜的表达,进一步降低新生 VV 的通透性。

[参考文献]

[1] 补阳还五汤稳定 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化易损斑块的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(15):112-119.

[2] 张军平,许颖智,李明,等. 四妙勇安汤对动脉粥样硬化模型兔氧化应激及炎症反应的影响[J]. 中医杂志,2010,51(1):72-74.

[3] 杨萃,袁卓,张军平. 四妙勇安汤对血管平滑肌细胞迁移的影响[J]. 中华中医药杂志,2013,28(5):1480-1483.

[4] 张军平,李明,李良军,等. 四妙勇安汤调控核因子- κ B 活性及抑制相关炎症因子的实验研究[J]. 中华中医药杂志,2010,25(3):372-376.

[5] 李萌,张军平,朱科,等. 四妙勇安汤调控滋养血管网重建稳定 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化易损斑块的实验研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2017,19(12):1989-1997.

[6] ZHOU J, Møller J, Danielsen C C, et al. Dietary supplementation with methionine and homocysteine promotes early atherosclerosis but not plaque rupture in ApoE-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2001,21(9):1470-1476.

[7] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北

京:人民卫生出版社,2002:200-223.

[8] Mulligan-Kehoe M J. The vasa vasorum in diseased and nondiseased arteries [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 298(2):H295-H305.

[9] Khurana R, Simons M, Martin J F, et al. Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal[J]. *Circulation*,2005,112(12):1813-1824.

[10] 付常宁. 基质金属蛋白酶 9 与冠心病患者斑块稳定性的关系[D]. 济南:山东大学,2015.

[11] Brew K, Dinakarpanian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2000, 1477(1):267-283.

[12] 李瑞,孟照辉. 基质金属蛋白酶在冠心病研究中的进展[J]. 临床医学,2017,37(8):123-127.

[13] 益心通脉颗粒对冠心病介入术后气虚血瘀证的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(20):201-206.

[14] Trotter T N, YANG Y. Matricellular proteins as regulators of cancer metastasis to bone[J]. *Matrix Biol*, 2016, 52(54):301-314.

[15] Camaré C, Pucelle M, Nègre-Salvayre A, et al. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque [J]. *Redox Biol*, 2017, 12:18-34.

[16] 漆仲文,李萌,张军平. 从滋养血管成熟化探讨稳定动脉粥样硬化易损斑块的作用[J]. 中国动脉硬化杂志,2017,25(7):737-740.

[责任编辑 周冰冰]