

心脉通片对动脉粥样硬化模型大鼠的防治作用及其机制研究

曹杰^{1*}, 王巧黎², 赵宏², 王珍^{3#} (1. 青岛市市立医院药剂科, 山东青岛 266000; 2. 青岛市中心医疗集团药剂科, 山东青岛 266042; 3. 青岛市市立医院中医科, 山东青岛 266000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)25-3499-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.25.13

摘要 目的: 研究心脉通片对动脉粥样硬化(AS)模型大鼠的防治作用及其机制。方法: 将48只大鼠随机分为正常组、模型组、阳性组(辛伐他汀片, 2 mg/kg)和心脉通片高、中、低剂量组(500、250、125 mg/kg), 每组8只。除正常组外, 其余各组大鼠均给予高脂饲料+ip维生素D₃复制AS模型; 造模同时各给药组大鼠ig相应药物, 正常组和模型组大鼠ig生理盐水, 每天1次, 连续10周。检测血清中胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、一氧化氮(NO)、内皮素1(ET-1)含量, 光镜下观察主动脉组织的病理变化, 并测定主动脉粥样斑块面积、内膜厚度。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠血清中TC、TG、ET-1含量及主动脉粥样斑块面积、内膜厚度均显著增加, NO含量显著降低($P < 0.01$); 主动脉有明显粥样硬化斑块形成。与模型组比较, 除心脉通片低剂量组大鼠血清中TC降低不显著外, 其余各给药组大鼠上述指标均明显改善($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并与剂量呈正相关; 各给药组大鼠主动脉病变均有改善。结论: 心脉通片对AS模型大鼠有一定的防治作用, 其机制可能与减少脂质沉积、减小动脉粥样斑块形成的面积、改善NO/ET平衡、减轻内皮损伤有关。

关键词 心脉通片; 动脉粥样硬化; 大鼠; 内皮损伤; 机制

Study on the Preventive and Therapeutic Effects of Xinmaitong Tablets on Model Rats with Atherosclerosis and Corresponding Mechanism

CAO Jie¹, WANG Qiaoli², ZHAO Hong², WANG Zhen³ (1. Department of Pharmacy, Qingdao Municipal Hospital, Shandong Qingdao 266000, China; 2. Department of Pharmacy, Qingdao Center Medical Group, Shandong Qingdao 266042, China; 3. Department of TCM, Qingdao Municipal Hospital, Shandong Qingdao 266000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the preventive and therapeutic effects of Xinmaitong tablets on model rats with atherosclerosis (AS) and corresponding mechanism. METHODS: 48 rats were randomized into normal group, model group, positive group (simvastatin tablets, 2 mg/kg) and the groups of high, medium and low-dose (500, 250, 125 mg/kg) Xingmaitong tablets, with 8 rats in each group. The rats in all groups except for the normal group were fed high fat diets and given vitamin D₃ ip for the establishment of AS model. Meanwhile, the rats in the drug administration groups were given corresponding drugs ig, while those in the normal group and the model group were given normal saline ig, once a day, for 10 consecutive weeks. The levels of cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), nitric oxide (NO) and endothelin 1 (ET-1) in serum were determined. The pathological change of the aorta tissue was observed under the light microscope, and the size of the aortic atherosclerotic plaque and intima thickness were measured. RESULTS: Compared to the normal group, the rats in the model group had significantly higher levels of TC, TG and ET-1 in serum, a markedly larger aortic atherosclerotic plaque, remarkably thicker intima and much lower level of NO ($P < 0.01$); and obvious aortic atherosclerotic plaque formation was found. Compared to the model group, the above-mentioned indexes of the rats in all drug groups all improved obviously ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), except that the decrease in TC in serum of the rats in the group of low-dose Xinmaitong tablets was not significant, which were positively correlated with dose; and the aortic lesion in drug groups was found to be improved. CONCLUSIONS: Xinmaitong tablets have certain preventive and therapeutic effect on the model rats with AS by a mechanism which may be related to the reduction in lipid deposition and the size of an atherosclerotic plaque, the improvement in NO/ET balance and the alleviation of an endothelial injury.

KEYWORDS Xinmaitong tablets; Atherosclerosis; Rats; Endothelial injury; Mechanism

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是危害人类健康最严重的心血管疾病,其形成机制复杂,发病率和病死率均较高^[1-2]。研制治疗AS的有效药物一直是国内外研究的重点和热点。心脉通片是由当归、丹参、葛根、毛冬青、夏枯草、牛膝、决明子、三七等10味中药材经提取后制成的薄膜包衣片,具有降

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药理学。电话: 0532-66981530。E-mail: 1016160703@qq.com

通信作者: 副主任医师, 博士。研究方向: 中医内科。E-mail: 37773887@qq.com

压、降脂的作用,临床上多用于高血压、高血脂的治疗^[3]。方中的当归、丹参、毛冬青、三七可疏导络脉、活血化瘀,牛膝则通利血脉,葛根可使血活气行、血运畅通,决明子、夏枯草、槐花、钩藤清热息风、平肝潜阳、解郁降压、宁清窍、祛眩晕,故心脉通片具有改善血液循环、疏通经络和养护心脏等作用。有关研究已证实了该药能够有效调节血脂代谢、升高血清中高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平^[4-5]。但目前关于心脉通片对AS作用的研究报道较少,故本文拟以血清中胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、一氧化氮(NO)、内皮素1(ET-1)为指标,并结合主

动脉病理变化,考察心脉通片对AS模型大鼠的防治作用及其可能的作用机制,为其用于AS的临床治疗提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 仪器

AU5400型全自动生化分析仪、BX43型光学显微镜(日本Olympus光学工业株式会社);80-2型离心沉淀机(上海手术器械厂);Biomias2001型图像分析系统(四川大学图像图形研究所);台式离心机(德国Hettich公司)。

1.2 药品与试剂

心脉通片(广州邦民制药厂有限公司,批号:150102304,规格:0.3 g/片);辛伐他汀片(广州南新制药有限公司,批号:3138930,规格:20 mg/片);NO试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20150102);ET-1酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(美国RD公司进口分装);水为生理盐水,其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

清洁级健康SD大鼠,48只,♂,体质量200~240 g,由青岛大学实验医学院动物实验室提供[许可证号:SCXK(鲁)2015-0022]。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将48只大鼠随机分为正常组、模型组、阳性组(辛伐他汀片,2 mg/kg,为成人临床用量的等效剂量)和心脉通片高、中、低剂量组(500、250、125 mg/kg,分别由成人临床用量的2、1、0.5倍剂量换算而得),每组8只。正常组大鼠每天给予普通饲料,其余各组大鼠每天给予高脂饲料(3%胆固醇、0.2%丙基硫氧嘧啶、0.5%胆酸钠、10%猪油、5%白糖、81.3%基础饲料),并一次性ip维生素D₃(60万u/kg)复制AS模型^[9]。造模同时,各给药组大鼠ig相应药物(以生理盐水为溶剂),正常组和模型组大鼠ig生理盐水,每天1次,连续10周。

2.2 血清中TC、TG、NO、ET-1含量测定

末次给药后,各组大鼠禁食12 h(期间自由饮水),然后麻醉取血,将血液静置2 h,以离心半径为4.9 cm、3 000 r/min离心10 min,分离血清,−80 ℃冰箱保存,备用。采用全自动生化分析仪测定血清中TC、TG含量;分别采用硝酸还原酶法和ELISA法测定血清中NO、ET-1含量,具体操作按照相应试剂盒说明书进行。

2.3 主动脉组织病理形态变化观察

取血完成后,股动脉放血处死各组大鼠,取主动脉,剥离主动脉根部至弓部的动脉,置于10%福尔马林溶液中固定,然后进行常规脱水、石蜡包埋、切片(4 μm厚),行苏木精-伊红(HE)染色后观察主动脉病理形态变化。

2.4 主动脉粥样斑块面积、内膜厚度测量

切取1~2 cm动脉组织置于10%福尔马林溶液中固定24 h,再按常规苏丹红IV染色方法处理。在有脂质浸润的斑块处主动脉内膜呈橘红或鲜红色,以红染部位面积占动脉内膜总面积的百分比表示动脉粥样斑块形成程度,定性观察大体标本中AS斑块形成的情况。用Biomias 2001图像分析系统定量测定主动脉粥样斑块面积大小,并计算病变斑块面积占总面积的百分比(以面积比进行结果分析),测量斑块的厚度(最大厚度)^[10],从每张切片上随机选取5个视野,测定内膜厚度。

2.5 统计学方法

数据采用SPSS 18.0软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检

验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血清中TC、TG、NO、ET-1含量测定结果

与正常组比较,模型组大鼠血清中TC、TG、ET-1含量明显增加,NO含量明显减少($P < 0.01$)。与模型组比较,除心脉通片低剂量组大鼠血清中TC含量减少不明显外,其余各给药组大鼠血清中TC、TG、ET-1含量明显减少,NO含量明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠血清中TC、TG、NO、ET-1含量测定结果见表1。

表1 各组大鼠血清中TC、TG、NO、ET-1含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=8$)

Tab 1 The contents of TC, TG, NO and ET-1 in serum of rats in all groups($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量,mg/kg	TC,mmol/L	TG,mmol/L	NO,μmol/L	ET-1,ng/L
正常组		1.24±0.44	0.72±0.18	20.62±8.21	49.09±2.19
模型组		12.96±4.12*	5.33±1.44*	8.12±1.95*	109.4±10.30*
心脉通片低剂量组	125	11.19±2.53	3.99±0.80*	12.25±1.28**	88.03±6.29*
心脉通片中剂量组	250	7.65±1.08*	2.54±1.11*	13.25±1.16*	60.86±8.04**
心脉通片高剂量组	500	5.82±1.62**	1.57±0.73**	16.68±1.43*	53.03±2.24**
阳性组	2	4.24±1.58**	1.08±0.33**	20.00±3.77**	52.76±1.64**

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.01$; vs. model group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.2 各组大鼠主动脉病理形态观察结果

3.2.1 肉眼观察结果 正常组大鼠主动脉内膜光滑,未见任何斑点和条纹;模型组大鼠主动脉管壁有大量黄白色脂样物,形成片状或脂质条纹;心脉通片高、中、低剂量组大鼠主动脉管壁有局限性的斑块隆起,动脉内皮下仍有泡沫细胞形成,但病变较模型组减轻,且呈一定的剂量依赖性;阳性组大鼠主动脉内皮光滑度明显好转,内膜未见增厚,中膜平滑肌排列整齐,但仍可见小的AS斑块。

3.2.2 光镜下观察结果 正常组大鼠主动脉内皮细胞连续、完整而光滑,中膜平滑肌以及弹性纤维完整;模型组大鼠主动脉内膜增厚,充满大量吞噬脂质的泡沫样细胞,泡沫细胞部分区域突入管腔,形成纤维增生性斑块;心脉通片高、中、低剂量组大鼠主动脉内皮下仅有少量泡沫细胞沉着,病变程度较模型组明显减轻;阳性组大鼠血管内膜光滑、未见增厚,中膜平滑肌排列整齐,仅见局部内皮粗糙,病变较心脉通片高剂量组略轻。各组大鼠主动脉病理切片见图1。

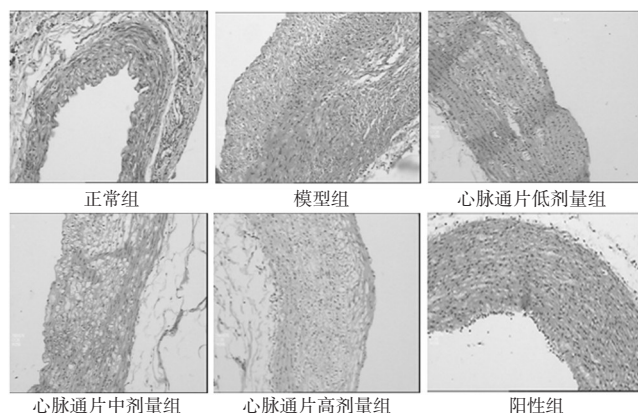


图1 各组大鼠主动脉病理切片图(HE,×400)

Fig 1 The aortic pathological sections of rats in all groups (HE,×400)

3.3 各组大鼠主动脉斑块面积、内膜厚度测定结果

与正常组比较,模型组大鼠主动脉斑块面积、内膜厚度明显增大($P<0.01$)。与模型组比较,阳性组和心脉通片各剂量组大鼠主动脉粥样斑块面积、内膜厚度减小($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠主动脉粥样斑块面积、内膜厚度测定结果见表2。

表2 各组大鼠主动脉斑块面积、内膜厚度测定结果($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab 2 The sizes of aortic atherosclerotic plaques and intima thicknesses of rats in all groups($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量,mg/kg	主动脉粥样斑块面积,%	内膜厚度, μm
正常组		0.60 \pm 0.19	0.031 \pm 0.031
模型组		47.87 \pm 3.27*	1.469 \pm 0.197*
心脉通片低剂量组	125	39.25 \pm 5.25*	1.162 \pm 0.245*
心脉通片中剂量组	250	26.50 \pm 6.27**	0.660 \pm 0.055**
心脉通片高剂量组	500	12.62 \pm 2.66**	0.240 \pm 0.078**
阳性组	2	10.75 \pm 4.62**	0.135 \pm 0.040**

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,** $P<0.05$,*** $P<0.01$

Note: vs. normal group, * $P<0.01$; vs. model group, ** $P<0.05$, *** $P<0.01$

4 讨论

AS是动脉内膜脂质及纤维成分沉积、平滑肌细胞及纤维增生并伴有坏死及钙化的慢性进行性疾病^[8]。多种因素(包括血液湍流、切变压、高脂血症、高血压、糖尿病等)均可引起内皮损伤^[9]。多数AS模型是建立在高脂饮食基础上。此外,维生素D可损伤血管内皮,使血浆脂蛋白易沉积在内皮下层,增加脂质对内皮的损伤作用,故在本实验中作者采用高脂饮食辅以ip维生素D3的方法复制AS模型。他汀类药物具有抑制平滑肌细胞增殖和血管内皮的炎症反应、稳定斑块、改善血管内皮功能、延缓AS进程、保护神经和抗血栓等作用^[10]。辛伐他汀片长期使用不但可以调节血脂,还可以显著阻滞AS的病变进展,减少心血管事件和不稳定型心绞痛的发生^[11],疗效确切,因此笔者选其为阳性药物。

内皮功能障碍是炎症和血栓形成过程中所伴随的血管反应性损伤,在AS病程中具有非常重要的作用^[12]。ET-1在内皮功能障碍发生过程中起着关键作用;NO有非常重要的抗AS作用,其功能包括控制血管紧张度、抑制血小板聚集、抑制白细胞黏附、调节平滑肌细胞增殖等^[13]。血管内皮损伤后,ET释放增加,血管收缩增强,同时促进平滑肌细胞增生,引起粥样斑块形成和扩大。NO生物学活性降低会导致ET相对增多,从而引起血管收缩、血管重塑和机能障碍^[14],故维持NO/ET平衡对维持内皮功能正常有重要作用。

现代医学对AS的治疗主要从抗凝、扩血管、调节血脂、溶栓、抗氧化等方面着手^[15]。而心脉通片中当归、三七等成分均有活血化瘀的功效,能有效地抑制AS的形成。本研究结果显示,给予心脉通片后大鼠血清中TC、TG、ET-1含量减少,NO含量增加,并呈一定的剂量依赖性。同时,大鼠主动脉粥样斑块面积约减少了26%~81%,光镜下心脉通片高剂量组的病理改变与阳性组相似,这说明心脉通片对AS模型大鼠具有一定

的保护作用。

综上,心脉通片对模型大鼠的AS具有一定的防治作用,其机制可能与减少脂质沉积、减小动脉粥样硬化形成的面积、改善NO/ET平衡、减轻内皮损伤有关。但由于本次实验时间较短,该药确切的作用机制需要长期的实验研究进一步证实。

参考文献

- [1] 林美容,刘晓艳,杜劲松,等.茶多酚与竹荪、海带提取物的抗氧化协同效应[J].食品工业,2015,36(4):181.
- [2] 杨润梅,陈慧敏,高南南,等.豚鼠动脉粥样硬化模型形成机制:LDL-C代谢异常[J].中国实验动物学报,2011,19(3):237.
- [3] 黄芳,裴河欢.心脉通胶囊治疗血脂异常合并颈动脉粥样硬化的临床疗效研究[J].实用心脑血管病杂志,2013,21(3):57.
- [4] 谭志辉,梁燕玲,蓝景生,等.心脉通胶囊配合阿托伐他汀治疗老年高血压患者颈动脉斑块的临床观察[J].中国当代医药,2013,12(3):231.
- [5] 郭静,代晓晓.心脉通胶囊治疗原发性高血压的疗效及对血液流变学、血脂的影响研究[J].实用心脑血管病杂志,2015,23(8):127.
- [6] 杨鹏远,芮耀斌,焦亚斌.动脉粥样硬化大鼠实验模型的建立[J].第二军医大学学报,2003,24(7):802.
- [7] 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,2000:1 268.
- [8] 张朝晖.动脉粥样硬化研究进展[J].中国中医急症,2008,17(3):378.
- [9] 孙鹏,王涛.颈动脉粥样硬化易损斑块及其相关生化标志物研究进展[J].中国临床神经外科杂志,2016,21(3):188.
- [10] 刘扬,李招兵,沈严.不同他汀类药物对动脉粥样硬化疗效的比较研究[J].重庆医学,2011,40(6):587.
- [11] 方草,陈武.不同剂量阿托伐他汀对比辛伐他汀治疗老年冠心病合并高脂血症的临床观察[J].中国药房,2013,24(10):3 773.
- [12] 董武松,李馨欣,杨俊.内皮素-1在心血管系统中的作用[J].国际心血管病杂志,2012,39(3):153.
- [13] 巫文宏,印建平.辛伐他汀对冠心病患者血清一氧化氮(NO)、内皮素(ET)、C反应蛋白的影响[J].中外健康文摘,2010,32(7):57.
- [14] Boutque SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature: new perspectives[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, doi:10.1152/ajpregu.00397.2010.
- [15] 黄威,董超.血府逐瘀汤对动脉粥样硬化大鼠MMP-9及TIMP-1的影响[J].医学研究与教育,2013,30(5):8.

(收稿日期:2016-02-23 修回日期:2016-06-15)

(编辑:林 静)