

降脂通脉方保护血管内皮细胞的临床与实验研究

王亚红¹ 牛福玲¹ 赵明镜¹ 钟 蓓² 郝锦红¹ 闫卫红¹ 吕晞滢¹ 王 伟¹ 李 楠³ 林 谦¹
戴雁彦¹ 赵 勇¹ 肖 岷¹ 唐 玲¹ 何兰英¹ 蒋学英¹ 指导:郭维琴¹ 王硕仁¹ 鲁伟星¹

摘要 应用降脂通脉方治疗 31 例动脉粥样硬化(AS)患者,并与洛伐他丁治疗的 30 例做对照。临床研究表明,降脂通脉方有调节血脂并抗动脉粥样硬化作用,作用机理可能是通过增加 6-酮-前列环素(6-keto-PGF_{1α})的合成,减少血浆内皮素(ET)的过量释放,使内皮细胞(EC)的功能得以恢复。内皮细胞培养实验提示,保护 EC 可能是本方抗 AS 的作用机理之一。

主题词 @ 降脂通脉方 血管/药物作用 内皮/药物作用

动脉粥样硬化(AS)所引起的心、脑血管疾病,严重危害人们的健康,其发病率和死亡率均居各种疾病的首位,故 AS 的研究和防治倍受人们的关注。目前认为,内皮细胞功能障碍是 AS 始发事件,因此,寻找保护内皮细胞的药物,从而抗 AS 具有重要的现实意义。本课题组对中药降脂通脉方进行了抗 AS 临床和相关的实验研究,现将临床及部分实验研究报告如下。

1 临床研究

1.1 一般资料:治疗组 31 例,其中男 16 例,女 15 例,平均年龄为 58.9 岁,伴有冠心病者 12 例,高血压病者 19 例,中风后遗症者 1 例,脑动脉硬化者 19 例,脂肪肝者 2 例,高脂血症者 31 例。对照组 30 例,其中男 13 例,女 17 例,平均年龄为 60.3 岁,伴有冠心病者 10 例,高血压病者 16 例,中风后遗症者 5 例,脑动脉硬化者 17 例,脂肪肝者 2 例,高脂血症者 30 例。两组性别、年龄、合并症经检验无显著性差异,具有可比性($P>0.05$)。纳入病例为冠心病稳定性心绞痛患者^[1],高血压Ⅱ期患者^[2],脑动脉硬化症的轻、中度患者^[3],符合高脂血症诊断的原发性高脂血症患者^[4]。排除半年内曾患急性心肌梗塞、脑血管意外、严重创伤或重大手术患者及因疾病、药物引起的高脂血症患者。虚证按中国中西医结合研究会 1986 年修订的《中医虚证辨证参考标准》^[5],血瘀证按中西医结合研究会血瘀证专业委员会于 1986 年修订的《血瘀证诊断标准》^[6],痰证按《现代中医内科学》制定的《痰证诊断标准》^[7]。

基金项目:国家自然科学基金资助(39570877)

1 北京中医药大学东直门医院心血管科,北京市东城区海运仓 5 号(100700)

2 北京建工医院

3 甘肃中医学院温病教研室

收稿日期:1999-12-23

1.2 治疗及观察方法:治疗组口服降脂通脉口服液(主要由红参、海藻、山楂等组成,规格为每支 10ml,由本院制剂室生产提供,批号 961206),每次 20ml,每日 3 次,早、中、晚餐前 30 分钟口服。对照组口服洛伐他丁(每片 20mg,由北京生物化学制药厂生产,批号 9708191),每次 1 片,每晚 1 次口服,2 个月为 1 疗程。治疗前及疗程结束后观察血脂,采用酶法测定总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C),比浊法测定载脂蛋白 A-I (ApoA-I)及载脂蛋白 B-100(ApoB-100)。低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)根据 Fridwald 公式 $LDL-C = TC - (HDL-C + TG/2.2)$ 。AI(动脉硬化指数)按下式求得: $AI = (TC - HDL-C)/HDL-C$ 。应用放射免疫测定法测定内皮素(ET)及 6-酮-前列环素(6-keto-PGF_{1α})。测定试剂盒均由中国人民解放军总医院东亚免疫技术研究所提供。在观察以上指标的同时,观察药物不良反应,重点观察治疗前后肝、肾功能及胃肠道不良反应。

1.3 结果

1.3.1 两组血清脂质治疗前后变化比较:两组治疗后 TC、LDL-C、ApoB-100 及 AI 均明显降低,差异有显著性($P<0.01$),而 TG 治疗组亦有明显下降($P<0.01$),对照组则下降不明显($P>0.05$)。见表 1。

1.3.2 两组血浆 ET 及 6-keto-PGF_{1α}变化比较:治疗后治疗组 ET 明显低于治疗前,差异有显著性($P<0.05$),而对照组治疗前后差异无显著性($P>0.05$)。治疗组 6-keto-PGF_{1α}治疗后较治疗前有升高趋势。见表 2。

表 1 两组血清脂质治疗前后变化比较($\bar{x} \pm s$)

项 目	治疗组(31 例)		对照组(30 例)	
	疗 前	疗 后	疗 前	疗 后
TC(mmol/L)	5.86±0.74	4.97±0.74*	6.31±0.90	5.21±0.70*
TG(mmol/L)	2.75±1.04	1.97±0.83*	2.45±1.09	2.13±0.92
LDL-C(mmol/L)	3.81±0.89	3.08±0.68*	4.31±0.93	3.29±0.68*
HDL-C(mmol/L)	1.26±0.34	1.33±0.34	1.28±1.29	1.23±0.28
ApoA-I(mmol/L)	1.40±0.13	1.41±0.17	1.35±0.13	1.36±0.15
ApoB-100(mmol/L)	0.98±0.17	0.91±0.14*	1.05±1.18	0.97±0.15*
AI	3.68±1.32	2.90±1.01*	4.20±1.44	3.46±1.22*

与本组疗前比较, * $P<0.01$

表2 两组治疗前后血浆 ET、6-keto-PGF_{1α}变化比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	ET		6-keto-PGF _{1α}	
	疗前	疗后	疗前	疗后
治疗组	52.09±12.99(30)	47.21±11.52(30)*	71.98±20.10(25)	89.03±55.04(25)
对照组	48.69±10.07(26)	51.27±10.27(26)	70.20±29.08(20)	62.82±22.75(20)

与本组疗前比较, * $P < 0.05$; 表中数据后括号内为例数

表3 各组 LDH 释放量、6-keto-PGF_{1α}含量、ET 测定值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	LDH(U/L)	6-keto-PGF _{1α} (pg/ml)	ET(pg/ml)
正常组	5	84.84±2.08	199.34±18.59	8.85±3.96
高脂血清组	6	172.37±14.33*	143.78±11.65*	37.98±19.54*
中药大剂量组	6	84.90±1.56 $\Delta\Delta$	187.54±41.43 Δ	11.21±5.04 $\Delta\Delta$
中药小剂量组	5	102.58±7.70 $\Delta\Delta$	172.44±32.25	10.23±3.66 Δ
对照药大剂量组	6	87.98±4.78 $\Delta\Delta$	172.35±32.54	12.35±5.99 Δ
对照药小剂量组	5	160.97±11.83	159.09±17.52	14.69±3.05 Δ

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与高脂血清组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

1.3.3 安全性观测: 治疗组用药后, 有2例出现口腔溃疡, 2例出现胃脘胀满, 对症处理后坚持完成本实验, 其余患者未见明显的毒副作用。对照组有2例出现严重的胃肠道反应, 患者不能坚持用药, 1例患者一过性谷-丙转氨酶增高, 坚持观察期满, 停药2周后恢复正常。

2 实验研究

2.1 实验方法: (1) 内皮细胞(EC)的培养与鉴定^[8]: 无菌条件收集健康产妇产前分娩胎儿的脐带, 参照文献方法, 以0.1%的I型胶原酶脐静脉灌注法分离内皮细胞(培养基为M199, 含20%胎牛血清)实验用第3~5代。用相差显微镜观察细胞形态、透射电镜观察、第Ⅷ因子相关抗原检测鉴定。(2) 含药血清与高脂血清的制备: 选择纯种雄性日本大耳白兔5只, 体重均为2.5±0.5kg, 2只分别每日给予降脂通脉口服液24ml/kg, 12ml/kg灌胃, 另2只分别每日给予洛伐他丁8mg/kg, 4mg/kg, 溶于60ml的蒸馏水中胃管灌胃, 另1只每日给予生理盐水60ml作为对照, 7天后, 于最后1次灌药后1小时(灌药前禁食不禁水12小时)耳缘动脉采血, 无菌分离血清, 经56℃, 30分钟处理, 分装后置-20℃保存备用。高脂血清的制备方法: 选取日本大耳白兔5只, 喂饲1%胆固醇, 4%猪油造模1个月, 耳缘动脉采血, 处理方法同前。(3) 实验分组及观察方法: 汇合EC分为6组, 分别为正常对照组、高脂组、中药大剂量组、中药小剂量组、对照药大剂量组、对照药小剂量组, 每组设置4~6个样本, 除正常对照组外, 余各组均加入2%高脂血清, 37℃5%CO₂培养箱中孵育24小时后, 正常组及高脂组加正常血清, 中药组、西药组加不同浓度的药物血清, 继续在37℃5%CO₂培养箱中继续培养24小时, 观察EC形态及功能变化。倒置相差显微

镜下观察EC形态学变化, 实验结束后收集细胞培养液, 用自动生化分析仪测定乳酸脱氢酶(LDH); 取上清液用放免分析法测定6-keto-PGF_{1α}及ET。

2.2 实验结果: (1) EC形态观察: 显微镜下, 正常EC为多角形细胞, 形状规则, 边界清楚, 细胞紧密, 单层镶嵌排列; 加入高脂血清48小时后, EC普遍收缩、脱落; 另加入降脂通脉口服液或洛伐他丁血清药孵育24小时后, EC仅少数脱落, 细胞形态大致正常(照片省略)。(2) EC功能变化: LDH释放量: 高脂血清组LDH释放增加, 与正常组比较有显著性差异($P < 0.01$); 降脂通脉方大、小剂量组LDH释放量较高脂血清组明显减少, 有显著性差异($P < 0.01$); 洛伐他丁组仅大剂量组LDH释放量减少, 有显著性差异($P < 0.01$)。提示降脂通脉方可减少LDH释放, 保护EC膜完整性。高脂血清组6-keto-PGF_{1α}释放量减少, 与正常组比较有极显著性差异($P < 0.01$); 降脂通脉方大剂量组较高脂血清组6-keto-PGF_{1α}含量增加($P < 0.05$), 洛伐他丁组6-keto-PGF_{1α}含量较高脂血清组无明显差异($P > 0.05$)。提示降脂通脉方可使6-keto-PGF_{1α}含量增加。高脂血清组ET值明显高于正常组($P < 0.01$), 降脂通脉方大、小剂量组ET值明显降低, 与高脂血清组比较有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 洛伐他丁大、小剂量组ET值明显降低, 与高脂血清组比较有显著差异($P < 0.05$)。提示降脂通脉方可降低细胞培养液中ET的含量。见表3。

3 讨论

AS是多层次、多环节的病变, 而在AS病因中, 最早和最有决定性的事件之一是内皮细胞功能紊乱。1996年12月的血脂异常专题研讨会中, 胡大一等指出, 调脂可使斑块稳定以及冠状动脉内皮细胞功能正

常化,从而减少急性冠状动脉综合征共同的始动环节发生。研究表明,血中 TC 升高,可使内皮功能受损,降低 TC 可改善内皮功能,预防斑块破裂;血清 HDL-C 与 AS 发病呈负相关。众多学者认为,综合 TC 及 HDL-C 这两个指标,计算 AS 指数,对估测发生 AS 危险性价值更大,LDL-C 与 TC 相关性良好,近年来许多研究证实,血 TG 增高也是一个独立的致 AS、冠心病的危险因素;ApoB-100 占 LDL-C 的 95% 以上,其含量能精确地反映 LDL-C 的水平。本研究结果表明,治疗组治疗后与治疗前比,AS 患者 TC、TG、LDL-C、ApoB-100 及 AI 均降低($P<0.01$),TG 疗后明显低于疗前,对照组则在降低 TG 方面无明显影响。可见,综合调节血脂,可能是降脂通脉方保护内皮细胞、抗 AS 的作用机理之一。

研究表明,高脂血清、LDL-C 培养的 EC 最先出现的形态变化是收缩,同时伴有通透性的增高^[10,11]。本实验结果也显示,当培养液中加入一定量高脂血清时,EC 出现收缩、细胞间隙增大,最后有的细胞发生脱落。在培养液中再加入中药降脂通脉药血清后,细胞形态有轻微改变。从形态学角度表明,中药降脂通脉方具有一定的拮抗高脂血清对 EC 损伤的能力。EC 损伤的定量分析方法中,常用的方法是测定细胞内乳酸脱氢酶(LDH)的释放量。本实验结果表明,加入高脂血清后,培养液中的 LDH 升高,提示高脂血清可使部分 EC 的细胞膜损伤,而另加降脂通脉方药的血清组,LDH 释放量减少,且较高脂血清组有显著性差异,提示降脂通脉方可保护 EC 膜完整性。

内皮细胞不仅是全身血管内膜的屏障结构,而且是一个重要的内分泌器官,是一种多功能细胞,可随生理、病理环境条件的变化而产生不同的反应。血管内皮细胞是合成前列环素(PGI_2)的主要场所。 PGI_2 极不稳定,降解后的稳定代谢产物是无活性的 6-keto-PGF_{1 α} ,故一般以 6-keto-PGF_{1 α} 来反应 PGI_2 的含量, PGI_2 是强烈的血管平滑肌舒张剂,并抑制血小板聚集,被视为阻止 AS 的“保护因子”。在 AS 时,内皮细胞功能损伤, PGI_2 可减少,在 AS 发生中起作用。从临床研究可以看出,治疗组 6-keto-PGF_{1 α} 较治疗前有升高趋势。在实验研究中,高脂血清组 6-keto-PGF_{1 α} 含量减少,而中药降脂通脉方组 6-keto-PGF_{1 α} 含量增加,与高脂血清组比较有显著性差异。内皮细胞也能合成、分泌 ET,ET 是迄今发现的较强的内皮源性血管收缩因子。ET 的生理作用非常广泛,一般认为,ET 的含量与血管内皮细胞受损程度呈正相关。本临床研究中,治疗组治疗后血浆 ET 含量较治疗前明显减少($P<$

0.05)。实验结果表明,高脂血清组细胞培养液中 ET 含量高于正常对照组($P<0.01$),加降脂通脉方药后血清培养液 ET 含量则较高脂血清组有明显下降($P<0.05$),其水平接近正常对照组,表明降脂通脉方具有一定的保护血管内皮细胞损伤的功能。

降脂通脉方是在中医理论指导下,结合长期临床观察总结而成的中药复方,采用健脾活血化痰法组方,本方用红参,味甘性温,入脾、肺经,有补中益气之功,为君药;山楂助脾行气运化,消食化积,散瘀化痰,助红参健脾化痰利湿,而为臣药;海藻苦咸而寒,入脾、肺、肾经,具软坚、消痰、利水、泄热之效,助山楂祛痰利湿,而为佐药。全方配伍应用,既治其本,补其虚,同时,祛痰湿,化瘀血,防患于未然。

参考文献

- 1 中药新药临床研究指导原则. 中华人民共和国卫生部制定发布. 第一辑. 1993;28.
- 2 陈灏珠,李宗明. 内科学. 第 4 版. 北京:人民卫生出版社,1996:228-229.
- 3 周慎. 脑动脉硬化症中医诊疗方案之文献及临床研究总结. 湖南中医杂志,1995,25(1):47.
- 4 血管系统药物临床研究指导原则. 中国临床药理学杂志,1988,4(4):245-254.
- 5 全国中西医结合虚证与老年病研究专业委员会. 中医虚证辨证参考标准. 中西医结合杂志,1986,6(10):598.
- 6 血瘀证诊断标准. 中西医结合杂志,1987,7(3):129.
- 7 何绍奇主编. 现代中医内科学. 北京:中国医药科技出版社,1992:602.
- 8 Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J Clin Invest, 1973, 52(11): 2745-2756.
- 9 Rossell R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. Nature, 1993, 362(1): 801-809.
- 10 刘清华,蒋雷,金军华,等. 载脂蛋白 AI 和高密度脂蛋白对内皮细胞保护作用的实验观察. 中华老年医学杂志,1996,15(1):33-35.
- 11 陈铁镇. 内皮细胞与动脉粥样硬化. 衡阳医学院学报,1987(增刊): 50-54.

讣告

中医杂志社退休干部、编审张坦同志因病医治无效,于 2000 年 1 月 15 日在北京逝世,享年 75 岁。

张坦同志大学毕业后,从事过教学、医疗工作,对中医、西医均有很深的造诣,他曾两次参加西医学习中医班,并认真学习和继承著名老中医的学术思想和临床经验,为从事中医和中西医结合工作打下了良好的基础。20 多年来他对《中医杂志》有着很深的感情,并为《中医杂志》成为享誉国内外的优秀期刊而尽心竭力,任劳任怨,无私奉献。

退休后他仍然关心着中医杂志社的工作,关注着中医药事业的发展。张坦同志长期患病,在工作期间和退休后与疾病进行了顽强的斗争,充分体现出他的革命乐观主义精神。