

方药研究

祛瘀消斑胶囊对易损斑块的稳定作用

赵玉霞¹ 刘运芳² 刘 艳² 燕芳芳² 于会明²

摘要 目的:应用血管内超声技术观察祛瘀消斑胶囊对易损斑块的稳定作用。方法:23 只兔给予球囊损伤腹主动脉加高脂饲料喂养,12 周末 20 只造模兔随机分为自然消退组和中药组,每组 10 只。24 周末在腹主动脉斑块处转染携带人野生型 p53 基因,两周后给予中国斑点蝥蛇毒和组胺触发斑块破裂。于 12 周末和 26 周末分别进行血脂和血管内超声检测,并和病理及电镜检测结果对比。结果:治疗后中药组实验兔血清总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇均显著低于自然消退组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);中药组实验兔血管外弹力膜面积、斑块面积和管腔面积狭窄百分率较造模后显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);造模后、自然消退组和中药组实验兔形态学检查有明显差异。结论:祛瘀消斑胶囊能明显增加易损斑块的稳定性,血管内超声技术是定性和定量判断斑块易损性的可靠方法。

主题词 动脉粥样硬化/中医药疗法 超声检查,介入性 @ 祛瘀消斑胶囊

Stabilizing Effect of Quyu Xiaoban Capsule on Vulnerable Plaque

Zhao Yuxia¹, Liu Yunfang², Liu Yan², et al.

(Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012; 2. Institute of Diagnosis, Medical College of Shandong University)

Objective: To observe the stabilizing action of Quyu Xiaoban Capsule on vulnerable plaque by using intravascular ultrasound (IVUS). **Methods:** Twenty-three rabbits with balloon-induced abdominal aortic wall injury were fed with high fat diet. At the end of 12th week, 20 of them were divided randomly into a natural regression group and a Chinese medicine group, 10 for each group. At the end of 24th week, recombinant adenovirus carrying human wild type p53 gene were injected via a catheter into the aortic segments rich in plaques. Two weeks later, the plaque rupture was triggered by Chinese Russell's Viper Venom and histamine. At the end of the 12th and 26th week, blood samples were taken to determine serum lipids and the abdominal aortas were detected with IVUS. The results were compared with pathological and electron microscopic results. **Results:** Compared with the natural regression group, total cholesterol (TC) and low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) in Chinese medicine group were significantly lower ($P < 0.05$ and 0.01 , respectively). Extra-vascular elastic membrane area (EEMA), plaque area (PA) and lumen area stenosis percent (LAS%) in Chinese medicine group were significantly lower than those before treatment ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), with significant differences in morphological examination. **Conclusion:** Quyu Xiaoban Capsule can promote stabilization of vulnerable plaques. IVUS technique provides a reliable method for assessing the vulnerability of AS plaque.

Key Words Atherosclerosis/TCM therapy; Ultrasound examination, interventional; @ Quyu Xiaoban Capsule

目前认为,动脉粥样硬化(AS)斑块糜烂、溃疡、破裂和血栓形成是绝大多数心脑血管事件发生的病理基础,而 AS 斑块是否发生这些病理变化取决于斑块是否稳定。祛瘀消斑胶囊是基于中医理论研制的新药,本研究将该药应用于兔易损斑块模型中,观察其稳定易损斑块的疗效,现报告如下。

1 材料

1.1 动物:雄性纯种新西兰兔 23 只,平均体重(2.1 ± 0.3) kg,由山东省农业科学院提供,动物合格证号:scxk(鲁)20040013。

1.2 仪器与试剂:携带人野生型 p53 基因的复制缺陷型重组腺病毒载体 Adv p53(滴度为 1.5×10^{10} pfu/ml),由上海医元生物基因科技发展公司提供;中国斑点蝥蛇毒(CRVV),由广州蛇毒研究所提供;组胺购自上海三杰生物技术有限公司。美国波士顿公司 Galaxy 血管内超声显像仪,血管内超声探头频率为 40MHz。

2 方法

2.1 模型制备:所有实验兔给予球囊损伤腹主动脉加高脂饲料(1%胆固醇,每只每日 120~140g)喂养,12 周末的实验兔即为 AS 组,随机抽取两只兔做病理学检测证实 AS 形成,造模过程中因腹泻死亡 1 只,将剩余的 AS 兔随机分为自然消退组和中药组,每组 10 只。自然消退组喂以普通饲料,不用药物。中药组喂以普通饲料并灌服祛瘀消斑胶囊。该胶囊由炙黄芪、莖

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30472262)

1 山东大学齐鲁医院中医科,济南市文化西路 107 号 250012

2 山东大学医学院诊断学研究所

收稿日期:2006-01-19;修回日期:2006-03-10

术、大黄、山楂、片姜黄等组成,药物加水 10 倍量,浸润 1 小时,加垫提取 3 遍(2 小时、1.5 小时、1 小时),提取液合并,滤过,浓缩至相对密度 1.16(垫测),喷雾干燥,制备颗粒,灌装胶囊,每粒胶囊 0.38g,相当于生药 1.7g,以黄芪甲苷为质控指标,每 1g 胶囊内容物含黄芪甲苷不得低于 1.25mg。药品由山东大学齐鲁医院制药厂提供,批准文号:济卫药制(99)F2002-02,给药量为生药 5.75g·kg⁻¹·d⁻¹,时间为 12 周。

2.2 斑块局部的基因转染:戊巴比妥钠麻醉动物,开腹暴露腹主动脉,在高频线阵探头的引导下,寻找腹主动脉在右肾动脉分支处与髂总动脉之间血管段(全长约 2~3cm)中的最大斑块处作为病毒载体的转染部位,向转染部位的管腔中注入 10⁶U Adv p53 重组载体,结扎转染部位上下两端的血管,10 分钟后恢复血供,在结扎部位做缝线标记,关闭腹腔,静脉给予抗生素预防感染。

2.3 药物触发:基因转染两周后,参考文献[1]的方法对实验兔进行药物触发。腹膜下注射 CRVV 0.15mg/kg 体重,30 分钟后,耳缘静脉注射组胺 0.02mg/kg 体重,于处死动物前 24 小时、48 小时给药两次。

2.4 血液生化检查:分别于实验开始、12 周末和 26 周末检测血清总胆固醇(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)。

2.5 血管内超声检查:分别于 12 周末和 26 周末药物触发后进行两次腹主动脉血管内超声检查,测量指标包括病变部位及参考部位的血管外弹力膜面积(EEMA)、管腔面积(LA)、斑块面积(PA)、管腔面积狭窄(LAS)百分率。

2.6 病理学及电镜检查:切取腹主动脉斑块破裂段及下段未破裂部位的腹主动脉 1cm,甲醛固定,常规石蜡

包埋,切片,用改良的 Movat 五色套染法染色切片^[2]。最终染色结果为:细胞核及弹力纤维为黑色、基质和黏蛋白为蓝色、纤维蛋白为深红色、胶原和网状纤维为黄色、肌细胞为红色。3%戊二醛固定的血管段分别应用扫描电镜及透射电镜观察斑块破裂及血栓形成情况。

2.7 统计学方法:所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.0 分析软件,组间比较采用 *t* 检验,计数资料采用 Fisher's 精确检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 各组实验兔血脂变化比较:表 1 示,与 AS 组比较,中药组实验兔 TC、TG 和 LDL-C 明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与自然消退组比较,中药组实验兔 TC 和 LDL-C 明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(注:实验开始到药物治疗前中药组实验兔因腹泻死亡 1 只,药物干预阶段中药组与自然消退组实验兔各死亡 1 只,原因分别为腹泻和上呼吸道感染。)

3.2 各组实验兔血管内超声检测结果比较:高脂喂养所形成的斑块多为低回声脂质斑块,药物触发前血管内超声检查未见斑块破裂及血栓形成。药物触发后中药组有 3 只实验兔斑块破裂,自然消退组有 5 只破裂,中药组斑块破裂率(37.50%)明显低于自然消退组(55.56%),但两组间比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。表 2 示,与 AS 组比较,中药组实验兔 EEMA、PA、LAS 百分率显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),自然消退组无显著变化($P > 0.05$)。

3.3 病理学及电镜检查结果:病理学检查示造模后脂质斑块弥漫存在,内膜明显增厚,斑块内有大量泡沫细胞。自然消退组见更多的纤维组织增生,中药组斑块减小,泡沫细胞减少,纤维组织明显增生,斑块破裂处及血栓内可见大量的炎症细胞浸润。扫描电镜检查示,内

表 1 各组实验兔血脂变化比较(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TC	TG	HDL-C	LDL-C
AS 组	19	37.16 ± 10.62	2.32 ± 2.07	2.97 ± 1.54	31.28 ± 9.47
中药组	8	8.73 ± 5.64 **△	1.17 ± 1.11 *	0.80 ± 0.17	7.06 ± 2.90 **△△
自然消退组	9	13.22 ± 7.58 *	0.99 ± 0.39 *	1.13 ± 0.30	10.37 ± 4.63 *

与 AS 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与自然消退组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

表 2 各组实验兔血管内超声检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	EEMA(mm ²)	LA(mm ²)	PA(mm ²)	LAS(%)
AS 组	19	15.11 ± 3.05	8.26 ± 3.95	5.76 ± 3.16	40.66 ± 3.23
中药组	8	9.63 ± 2.37 **△	7.42 ± 2.06	2.43 ± 1.26 *△	26.94 ± 2.17 *
自然消退组	9	13.22 ± 7.58 *	7.73 ± 2.58	5.38 ± 2.41	33.66 ± 3.06

与 AS 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与自然消退组比较,△ $P < 0.05$

皮细胞排列紊乱,呈束状稀疏分布。透射电镜示AS组及自然消退组内皮细胞不完整,平滑肌细胞呈分泌表型,并大量积聚,胞浆内充满脂肪空泡,线粒体水肿,内质网池状扩张,胞核内可见异染色体边聚。中药组泡沫细胞减少,脂肪空泡明显减少,平滑肌细胞形态基本正常,线粒体轻度空泡变性,内质网轻度肿胀。

4 讨论

本研究中我们将祛瘀消斑胶囊应用于兔易损斑块模型中,发现该药能预防AS斑块的破裂,增强斑块的稳定性。近年研究表明,易损斑块的破裂是急性冠脉综合征最根本的始动因素^[3],易损斑块具有较薄的纤维帽,脂质聚集及大量炎性细胞浸润等明显的形态学特点^[4,5]。决定斑块易损性的主要因素是聚集的脂质的增多以及炎症造成的纤维帽变薄,调脂治疗能够减少斑块内脂质含量和张力、减轻炎症、改善血栓形成和纤溶活性之间的平衡。本研究中,祛瘀消斑胶囊治疗后血脂显著降低,病理学及电镜检测结果同时提供了形态学方面的证据,提示该药能显著降低血脂水平,从而增加斑块的稳定性。

我们利用已建立的易损斑块的动物模型,应用血管内超声对AS斑块进行了动态检测。AS组实验兔可见增生的内中膜和隆起的斑块,多为低回声的脂质斑块,出现此类型斑块分析与动物模型种类有关;药物触发后中药组实验兔EEMA、PA、LAS百分率较造模后显著降低,血管内超声显示中药组有3只实验兔斑块破裂,自然消退组有5只斑块破裂,与病理学检查结果一致,两组间差异无显著性意义的原因考虑与样本数较少有关,但中药组斑块破裂率明显低于自然消退组,

进一步证实了该药稳定斑块的作用。

近年来,关于AS病变痰浊血瘀的理论受到许多学者的重视。根据中医理论,AS的病理机制多为气虚日久,瘀阻脉络,邪气深入经隧,瘀浊胶结而形成痰瘀积聚,如王清任所言:“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留为瘀。”痰浊阻滞血气的运行,则易形成血瘀;血瘀阻滞则使津液停蓄化而为痰,痰瘀互结而导致AS,引发中风、冠心病诸病。关于中药治疗AS的文献很多^[6],但这些研究大多针对稳定性斑块的消退,中药针对不稳定性斑块的治疗少见报道。祛瘀消斑胶囊是本课题组近年来开发的具有调脂、保护血管内皮功能的中成药。方中黄芪大补元气以帅血运为君药;莪术、大黄、山楂破血通脉,化瘀泻浊,消滞散结为臣药;片姜黄辛香走串,散寒通络,领诸药直达络中为使药,诸药合用,共奏补气逐瘀、化浊通络之功。

参考文献

- 1 Constantinides P, Chakravarti RN. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures. Arch Pathol, 1961, 72: 197~208.
- 2 李莉, 翟同钧, 陈融, 等. Movat 五色套染法的改进及应用. 临床与实验病理学杂志, 2002, 18(6): 660~662.
- 3 Falk E. Why do plaques rupture? Circulation, 1992, 86(6 Suppl): III 30~III 42.
- 4 Davies MJ. Pathophysiology of acute coronary syndromes. Indian Heart J, 2000, 52(4): 473~479.
- 5 Falk E. Morphologic features of unstable atherothrombotic plaques underlying acute coronary syndromes. Am J Cardiol, 1989, 63(10): 114E~120E.
- 6 荆涛. 血管平滑肌细胞凋亡与动脉粥样硬化及其中药防治. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(3): 271~273.

(上接第853页)

有差异性表达。说明肥胖痰湿人有着不同于正常体重者和肥胖非痰湿人的独特的基因表达谱。依据这些差异基因进行的聚类分析,又准确地将肥胖人中痰湿体质者与非痰湿体质者分成了两组。说明肥胖痰湿体质者在外周血细胞中有区别于普通肥胖人的基因表达特征。进一步对痰湿肥胖人和非痰湿肥胖人之间的115个差异表达探针组的生物功能进行主题分析,发现ATP结合基因在两组间有显著性差异。这些ATP结合基因包括了Janus蛋白激酶2、类CDC蛋白激酶1、蛋白tyrosine去磷酸化酶、核受体结合蛋白等。提示肥胖痰湿体质人外周血细胞可能存在某些生物功能的紊乱。这为痰湿体质的判定,临床上对此类病理体质的调整、改善提供了初步的客观分子生物学依据。

参考文献

- 1 王琦. 中医体质学. 北京: 中国医药科技出版社, 1995: 99~102, 118.
- 2 Hosack DA, Dennis G Jr, Sherman BT, et al. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. Genome Biol, 2003, 4(10): R70.
- 3 Stoneking M. Single nucleotide polymorphisms: from the evolutionary past... Nature, 2001, 409(6822): 821~822.
- 4 Wu X, Zhao H, Suk R, et al. Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. Oncogene, 2004, 23(38): 6500~6523.
- 5 Goldstein DB, Tate SK, Sisodiya SM. Pharmacogenetics goes genomic. Nat Rev Genet, 2003, 4(12): 937~947.
- 6 Roses AD. Pharmacogenetics and drug development: the path to safer and more effective drugs. Nat Rev Genet, 2004, 5(9): 645~656.
- 7 王琦, 盛增秀. 中医体质学说. 南京: 江苏科学技术出版社, 1982: 50~51.