

• 方药研究 •

茵陈五苓散抗大鼠动脉粥样硬化作用机理探讨

王东生¹ 唐发清² 肖长江² 陈方平² 袁肇凯² 黄献平² 郭志华¹

(1. 中南大学湘雅医院, 湖南省长沙市湘雅路 87 号, 410008; 2. 湖南中医学院)

[摘要] **目的** 探讨茵陈五苓散对动脉粥样硬化大鼠的作用机理。 **方法** 70 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、茵陈五苓散组、绞股蓝组。采用高脂饲料喂饲法复制大鼠动脉粥样硬化模型, 治疗 1 个月后分别检测血脂、血液流变学、主动脉组织学及超微结构变化、血管平滑肌细胞(VSMC)bcl-2 mRNA 的表达。 **结果** 茵陈五苓散降低总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇, 升高高密度脂蛋白胆固醇, 降低血液黏度、红细胞压积、血小板黏附率, 维持主动脉组织结构, 下调基因 bcl-2 mRNA 的表达均优于绞股蓝。 **结论** 茵陈五苓散具有良好的抗动脉粥样硬化作用, 其下调相关基因 bcl-2 mRNA 的表达可能是其作用机理。

[关键词] 茵陈五苓散; 动脉粥样硬化; 血管平滑肌细胞; 基因表达; 血脂; 血液黏度

Effect and Mechanism of Yinchen Wuling Powder on Atherosclerosis RatsWANG Dong-Sheng¹, TANG Fa-Qing², XIAO Chang-Jiang², et al.

(1. Xiangya Hospital of Centre-south University, Changsha 41008; 2. Hunan University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the effect and mechanism of Yinchen Wuling Powder (Powder of Oriental Wormwood and Five Herbs with Poria) on atherosclerosis (AS) rats. **Methods** Totally 70 Wistar rats were randomized into normal group, model group, Yinchen Wuling Powder group, and Gypenosides group. The AS models were made by feeding greasy food for producing AS plaque in aorta. The serum lipid, blood rheology, ultrastructure of aorta tissues, and bcl-2 mRNA expression of VSMC were tested after one month to see the changes. **Results** Yinchen Wuling Powder could obviously decrease the total cholesterol, triglyceride, and low density lipoprotein cholesterol; increase the high density lipoprotein cholesterol; reduce the blood viscosity, packed cell volume, and platelet adhesion rate; maintain the aorta structure; and lower the bcl-2mRNA expression. The effect was better than that of Gypenosides. **Conclusion** Yinchen Wuling Powder has a significant effect on AS and its functional mechanism may lie in lowering the bcl-2 mRNA expression.

Key Words Yinchen Wuling Powder; Atherosclerosis; Vascular smooth muscle cell; Gene expressi; Blood lipid; Blood viscosity

动脉粥样硬化(AS)是严重危害人们健康的一类疾病。茵陈五苓散系张仲景经典名方, 多年来课题组运用茵陈五苓散治疗高脂血症, 获得良好的治疗效果^[1]。本研究采用茵陈五苓散治疗 AS 模型大鼠, 观察其对 AS 血脂、血液流变学、细胞超微结构及基因表达的影响, 现报告如下。

1 材料

1.1 动物

健康清洁级雄性 Wistar 大鼠, 体重(200±20)g, 中南大学实验动物学部提供, 动物许可证号: SYXK(湘)2005—0005。

1.2 主要试剂与仪器设备

茵陈五苓散口服液(YCL)药物组成: 茵陈 30g, 泽泻 15g, 茯苓 9g, 猪苓 9g, 白术 9g, 桂枝 4g, 由中南大学湘雅医院中药房提供, 每毫升含生药 2g。绞股蓝总苷

片(Met): 陕西省安康地区中药厂生产(批号: 20000409); 胆固醇试剂盒由中国医药集团上海化学试剂公司生产(批号: 20001108); 血脂、血糖试剂盒, 温州东瓯生物工程有限公司; Trizol: 上海生工生物工程公司产品; 逆转录酶、TaqDNA 聚合酶: Promega 产品。LKB800 石蜡切片机, 德国产; PE480 型 PCR 热循环仪: 美国 PE 公司生产; BIO-RAD 凝胶成像系统: 美国 BIO-RAD 公司生产; 瑞士 LKB 公司 11800 修块机, 日立 H-600 透射电镜。

2 方法

2.1 模型制备

大鼠 AS 模型制备参照高脂饲养喂饲法^[2], 4%胆固醇、10%猪油、0.2%甲基硫氧嘧啶、86%基础饲料(其中面粉 20%, 米粉 2%, 玉米 20%, 麸皮 25%、豆料 20%、骨粉 2%、鱼粉 2%), 混匀后压制成高脂饲料, 饲喂 1 个月后, 抽样检测大鼠主动脉, 以发现动脉粥样硬化斑块为造模成功。

2.2 分组及给药

70 只大鼠随机分为 4 组, 正常组 10 只; 普通饲养,

基金项目: 中国博士后科学基金(2003033474)、湖南省中医管理局资助项目(200215)

通讯作者: 王东生, wdsh66@yahoo.com.cn, 13808481269

灌胃用生理盐水 $10\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 其余 60 只造模成功后分为 3 组, 每组各 20 只。模型组: 生理盐水灌胃 $10\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 茵陈五苓散组(YCL 组): 灌胃茵陈五苓散药液, 药液浓度稀释为 $0.5\text{g}/\text{ml}$, 灌胃剂量为 $3.125\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 绞股蓝总苷片组(Met 组): 灌胃绞股蓝总苷片药液, 药液浓度为 $10\text{mg}/\text{ml}$, 剂量为 $100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 共 30 天。

2.3 取材

给药后 30 天, 大鼠注射 2% 戊巴比妥钠 $45\text{mg}/\text{kg}$ 腹腔麻醉, 切开颈部分离颈动脉, 插管依次取血 3 管, 每管 2.5ml , 分别检测血脂、血液流变学; 分离主动脉, 剥去外膜脂肪, 从主动脉弓处剪去 $2\text{mm} \times 2.5\text{mm}$ 1 块立即投入 2.5% 戊二醛固定液中作电镜检测; 取 1cm 长主动脉投入 10% 甲醛中固定, 作 HE 染色切片光镜检测; 其余部分剥去内膜、外膜, 在生理盐水中漂洗 2 次, 立即放冷冻管, 投入液氮中保存待其因表达检测。

2.4 检测指标及方法

2.4.1 血脂检测 包括总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。

2.4.2 血液流变学检测 包括全血黏度(高切、中切、低切)、血浆黏度(PV)、白细胞压积(Hct)及血小板黏附率(PAdT)。

2.4.3 光镜标本制作 水浴恒温捞片, 二甲苯脱蜡, 无水乙醇洗蜡 $\rightarrow$ 95%乙醇 $\rightarrow$ 80%乙醇, 水洗, Hurr's 苏木素染色, 水洗多余染料, 酸乙醇(100ml 乙醇+ 1ml 盐酸)分色 1~5 秒, 水洗促兰, 1%伊红染色, 95%乙醇脱水两次, 无水乙醇脱水两次, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光镜检测。

2.4.4 电镜标本制作 先用 2.5% 戊二醛固定, 0.1M PBS 漂洗, 1% 锇酸后固定, 丙酮逐级脱水, 50% $\rightarrow$ 70% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 100%, 共 4 次, Epon812 环氧树脂全埋, 修块机修块, 超薄切片机切片, 醋酸铀、硝酸铅双重染色, 透射电镜观察并照像。

2.4.5 基因表的测定 参照文献[3,4]方法。(1)总 RNA 提取: 采用一步法提取大鼠主动脉组织总 RNA。琼脂糖凝胶电泳可见较明亮的 RNA 条带, 总 RNA 质量符合实验要求。(2)逆转录: 各取剩余 RNA $15\mu\text{l}$ 加入 oligo(dT) $1\mu\text{l}$, $5000 \times g$ 4°C 离心 3 秒, 放 65°C 水浴 10 分钟, 再放冰上骤冷, 于该 EP 管中加入 DEPC 处理水 $20\mu\text{l}$, Rnasin $1\mu\text{l}$, 10mM DNTPs $2\mu\text{l}$, buffer $10\mu\text{l}$, 逆转录酶 $1\mu\text{l}$, 置恒温水浴槽中, 42°C 孵育 2 小时, 取出后置冰上骤冷, 贮存 -86°C 备用。(3)PCR 扩增: 引物设计, 内参照 β -actin 上游引物为 5'-GAGCACCTGTGCTG

CTCACCTAGG-3', 下游引物为 5'-GTGGTGGTGA AGCTGTAGCCACGCT-3', PCR 扩增片段大小为 310bp 。据此设计上游引物 5'-GGATTGTGGC-CTTCTTTGAG-3' GC 含量为 50%, T_m 值 50.9°C , 下游引物 5'-TGTGTGTGTGTGTTCTGC-3' GC 含量 50%, T_m 值 50.2°C , RCR 扩增片段长度 411bp 。PCR 反应逆转录(RT)产物 $5\mu\text{l}$, $10 \times \text{dNTPS}(2\text{mM})$ $10\mu\text{l}$, $10 \times \text{PCR buffer}$ $5\mu\text{l}$, Taq polymerase $2\mu\text{l}$, DEPC 处理水 $24\mu\text{l}$, 目的基因上下游引物及内参照 β -actin 各 $1\mu\text{l}$ 均加在一个 PCR 反应管中, 总反应体积为 $50\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件: 94°C 45 秒, 60°C 45 秒, 72°C 90 秒, 35 个循环, 72°C 延伸 10 分钟。(4)电泳: 取 1.2g 琼脂糖加 $0.5 \times \text{TBE}$ 100ml , 加热溶解, 加 1% 溴化乙锭 $5\mu\text{l}$, 制胶上样电泳, 当溴酚蓝指示至目标位置终止电泳, 取出凝胶, 放在紫外照射仪下观察, 用凝胶成像系统记录电泳结果, 计算机图像处理, 测定各个条带的灰度值, 以目的基因与内参照的灰度面积比值为半定量资料, 进行统计分析。

2.7 统计学方法

采用 SPSS10.0 软件包进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用方差分析和 q 检验。

3 结果

3.1 茵陈五苓散对 AS 大鼠血脂的影响

表 1 示, 茵陈五苓散对血脂有较明显的疗效, 优于 Met 组, 在降低 TC、TG、LDL-C 的同时, 升高 HDL-C, 有明显的降脂作用($P < 0.01$)。

3.2 茵陈五苓散对 AS 大鼠血液流变学的影响

表 2 示, 模型组血液流变学指标均严重异常, 药物干预结果显示, 茵陈五苓散疗效明显优于 Met 组, 提示茵陈五苓散能改善血液流变性, 降低血液黏稠度。

3.3 茵陈五苓散对 AS 大鼠细胞超微结构的影响

电镜下, YCL 组细胞超微结构趋于正常组, 胞浆内线粒体较丰实, 结构清晰, 但仍可见凋亡细胞, 模型组和 Met 组均见血管内皮细胞固缩, 电子密度增高, 细胞核扭曲裂解, 形成凋亡小体, 开始细胞凋亡, 血管腔内有明显的纤维素样血栓形成, 即粥样斑块形成, 说明茵陈五苓散能改善细胞凋亡现象, 维持细胞超微结构, 消退斑块。

3.4 茵陈五苓散对 AS 大鼠组织学检查的影响

电镜下, YCL 组与正常组大鼠主动脉组织结构一致, 内膜光滑, 中膜血管平滑肌细胞(VSMC), 呈梭形, 排列有序, Met 组见脂质条纹 VSMC 增生。模型组明显斑块形成突出动脉腔内, 说明茵陈五苓散能消退斑块, 维持主动脉组织结构功能。

表 1 各组大鼠血脂变化比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常组	10	2.08±1.38	0.79±0.10	1.12±0.15	1.00±0.13
YCL 组	14	2.25±0.18▲△	0.82±0.11▲△	1.09±0.11▲△	1.03±0.10▲△
Met 组	11	2.75±0.13	1.16±0.14*	0.70±0.10*	1.16±0.12*
模型组	12	2.93±0.20*	1.31±0.18*	0.59±0.12*	1.49±0.16*

与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, ▲ $P<0.01$; 与 Met 组比较, △ $P<0.01$

表 2 各组大鼠血液流变学变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	全血黏度 (mPa · s)			PV (mPa · s)	Hct	PAdT (%)
		低切	中切	高切			
正常组	10	20.8±5.82	13.55±2.39	5.31±0.88	1.94±0.16	0.50±0.01	44.5±1.78
YCL 组	14	22.12±5.59▲▲	14.53±3.26▲▲	5.50±0.64▲▲	1.93±0.16▲	0.49±0.01▲▲	45.8±2.5▲▲
Met 组	11	28.06±5.32*	18.46±2.44*	6.31±0.69*	2.21±0.39	0.57±0.02*	57.9±4.5*
模型组	12	33.95±8.47*	21.66±2.89*	6.65±0.75*	2.29±0.21	0.56±0.02*	57.9±3.1*

与正常组比较, * $P<0.01$; 与模型组比较, ▲ $P<0.05$, ▲▲ $P<0.01$; 与 Met 组比较, △ $P<0.05$, ▲△ $P<0.01$

3.5 茵陈五苓散对 AS 大鼠 VSMC bcl-2 mRNA 表达的影响

表 3 示, Met 组、YCL 组对 AS 大鼠 VSMC bcl-2 mRNA 过度表达, 均有下调作用, 但 YCL 组较模型组下降更为明显, 差异有显著性意义 ($P<0.01$), 说明茵陈五苓散对 bcl-2 mRNA 表达的下调作用优于绞股蓝。

表 3 各组大鼠 VSMC bcl-2 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	bcl-2 mRNA
正常组	10	0.64±0.14
YCL 组	10	0.71±0.16▲
Met 组	10	0.82±0.17*
模型组	10	0.96±0.20**

与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, ▲ $P<0.01$; 与 Met 组比较, △ $P<0.05$

4 讨论

现代研究认为, 脂质代谢的异常可做为“痰浊”辨证的客观指标^[5,6], “痰浊”在 AS 中起着重要作用, AS 的血液高黏滞性, 血液流变学及血小板功能的改变又与中医所述的血瘀证相一致, 血液流变学及血小板功能的改变又是瘀血证微观辨证的重要指标^[7]。因而使用痰浊瘀血相关的理论可以阐释 AS 形成的机制, 用清利降浊祛瘀之剂能使斑块软化消散。本研究结果显示, 茵陈五苓散能调整脂质代谢, 使 TC、TG、LDL-C 水平下降, HDL-C 水平上升; 降低全血黏度高切、中切、低切, 血浆黏度、红细胞压积和血小板粘附性, 使之恢复正常。从器官组织水平看, 茵陈五苓散能维持主动脉组织结构、功能、血管内膜光滑、完整、VSMC 梭型排列有序。从细胞水平看, 茵陈五苓散能维持细胞结构的完整性, 电镜下见 YCL 组与正常组一致, 而模型组、Met 组粥样斑块、细胞凋亡明显、细胞核固缩裂解, 血

管内膜有纤维素样血栓形成。从分子水平看, 茵陈五苓散能调整 AS 相关基因的表达并使之趋于正常。运用 RT-PCR 法发现模型组 bcl-2 mRNA 的表达均上调, YCL 组 bcl-2 mRNA 的表达均下调, 说明茵陈五苓散下调相关基因 bcl-2 mRNA 的表达可能是其治疗的分子机理。

参考文献

[1]王东生,周衡,殷文学.清热利湿法调脂的临床观察.中国中医药信息杂志,2001,8(5):50~51.
[2]苗明山主编.实验动脉和动物实验技术.北京:中国中医药出版社,1997:199.
[3]卢圣栋主编.现代分子生物学实验技术.北京:高等教育出版社,1993:95~154.
[4]萨姆布鲁克著,金冬雁译.分子克隆实验指南.2版.北京:科学出版社,1998:343~451.
[5]王东生,袁肇凯,黄献平,等.冠心病痰瘀病理的临床研究.山东中医药大学学报,2003,27(2):109~111.
[6]宋剑南.从生物化学角度看痰及痰瘀相关.中国中西医结合杂志,2000,6(3):42.
[7]陈可冀,马晓昌.关于传统血瘀证的现代分类.中国中西医结合杂志,2000,20(7):487.

(收稿日期:2006-06-22,修回日期:2006-09-21)

[编辑:李春梅]

欢迎邮购《中医杂志》光盘合订本

本盘收录了1951年~1986年、1995年~2004年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字),您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章。本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。
1951年~1986年光盘还收录了扫描的原文期刊版面图像。
1951~1986年(4张光盘)480元
1995~2004年(1张光盘)280元。
汇款地址:北京市东直门南小街16号中医杂志社医海林音像书店,邮编:100700。联系人:浦战兵,E-mail: 64013164@163.com。请在汇款单附言栏写明购买光盘种类及联系电话。