

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.04.014

实验研究

丹黄通脉方对颈动脉粥样硬化大鼠血清基质金属蛋白酶 9、基质金属蛋白酶抑制剂 1 的影响

齐婧^{1,2}, 王永刚^{1,2}, 郑刚^{1,2*}, 陈敏娜^{1,2}, 罗瑜³, 钟伟^{1,2}, 尚俊平^{1,2}

(1. 陕西中医药大学心脑血管病研究所, 陕西省咸阳市渭阳西路五号, 712000; 2. 陕西中医药大学第二附属医院; 3. 榆林市中医医院)

摘要 目的 探讨丹黄通脉方对颈动脉粥样硬化斑块的影响及可能作用机制。方法 30 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、丹黄通脉方组, 每组 10 只。模型组、丹黄通脉方组采用高脂复合饲料及腹腔注射维生素 D₃ 法制作颈动脉粥样硬化模型。造模成功后丹黄通脉方组给予丹黄通脉方 10 ml/(kg·d) 灌胃, 空白组及模型组给予等量蒸馏水, 每日 2 次, 连续 6 周。观察各组大鼠颈动脉病理形态学变化, 测定血清基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP-1) 水平。结果 光镜下观察显示, 模型组血管内膜明显增厚, 泡沫样细胞堆积, 弹力纤维层不同程度破坏、断裂。丹黄通脉方组血管内膜稍增厚, 可见少量泡沫样细胞形成, 弹力纤维层稍紊乱, 程度较模型组轻。与空白组比较, 模型组和丹黄通脉方组颈动脉内膜、中膜面积比 (I/M)、MMP-9、TIMP-1 均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丹黄通脉方组大鼠 I/M、血清 MMP-9 水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 丹黄通脉方能够下调 MMP-9 水平, 可能是改善颈动脉粥样硬化和稳定斑块的作用机制之一。

关键词 颈动脉粥样硬化; 丹黄通脉方; 组织形态学; 基质金属蛋白酶 9; 基质金属蛋白酶抑制剂 1

动脉粥样硬化常可累及多处血管, 如颈动脉、冠状动脉、主动脉、肾动脉等, 是心脑血管疾病产生的病理基础。约有 20% ~ 35% 的颈动脉粥样硬化可导致缺血性脑中风的发生, 且颈动脉不稳定斑块脱落可导致患者快速致残致死, 风险远远大于其引起的颈动脉狭窄^[1]。研究表明, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMPs), 可降解和削弱帽状腱膜基质, 导致斑块不稳定^[2-3]。我们前期研究表明, 丹黄通脉方具有调节血脂代谢和抗炎作用, 防治颈动脉粥样硬化临床疗效确切^[4-6]。本研究通过建立颈动脉粥样硬化大鼠模型, 观察丹黄通脉方对颈动脉内膜形态学、血清基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP-1) 水平的影响, 进一步探讨丹黄通脉方调控颈动脉粥样硬

化形成和稳定斑块的可能作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 (120 ± 10) g, 购于第四军医大学动物实验中心, 实验动物合格证号: SCXK-(军) 2015-0014。

1.2 药品、试剂与仪器

丹黄通脉方由陕西中医药大学第二附属医院药剂科制备, 组成: 丹参、黄连、葛根、三七剂量比例为 2 : 2 : 1 : 0.5, 制备成含生药量 1g/ml 的药液, 备用。维生素 D₃ 注射液 (上海通用药业股份有限公司, 批号: 121125); 丙硫氧嘧啶 (广东华南药业集团有限公司, 批号: 120501); TIMP-1、MMP-9 试剂盒 (美国 R&D Systems 公司, 批号: 20141201A、20140801A); 戊巴比妥钠 [中国医药 (集团) 上海化学试剂公司, 批号: 20120801]。高脂复合饲料配方: 76.5% 基础饲料、10% 蛋黄粉、8% 猪油、4.8% 食盐、0.5% 胆盐、0.2% 丙硫

基金项目: 陕西省教育厅科学研究项目 (14JK1192); 陕西省中医药管理局中医药科研专项 (13-JC00115-LC016); 陕西省科技统筹创新工程计划 (2013KTCQ03-05); 陕西省科技厅科学技术研究发展计划项目 (2015JM8384)

* 通讯作者: zhenggang2283@163.com, (029) 33578207

氧嘧啶 (广东华南药业集团有限公司, 批号: 120501)。EG 1160 石蜡包埋机(德国 Leica 公司); RM 2135 轮转切片机 (德国 Leica 公司); BX43 光学显微镜(日本 Olympus 公司); Quantiment 520 计算机图像分析仪 (Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

30 只 SD 大鼠普通饲料喂养, 自由饮水, 适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表分为空白组、模型组、丹黄通脉方组, 每组 10 只。模型组、丹黄通脉方组采用高脂复合饲料及腹腔注射维生素 D₃ 法制作颈动脉粥样硬化模型^[4]: 高脂复合饲料喂养, 于高脂复合饲料喂养当日给予维生素 D₃ 60 万 IU/kg 腹腔注射 1 次, 随后于第 3、6、7 周首日分别给予维生素 D₃ 10 万 IU/kg 腹腔注射 1 次, 自由饮水。空白组给予普通饲料喂养。于第 7 周末, 模型组、丹黄通脉方组各处死 1 只大鼠, 取颈动脉行 HE 染色, 镜下见内膜明显增厚, 提示造模成功。于第 8 周开始, 丹黄通脉方组给予丹黄通脉方 10 ml/(kg·d) 灌胃, 空白组及模型组给予等量蒸馏水。每日给药 2 次, 连续给药 6 周。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 组织病理形态学观察 于给药第 6 周末, 各组大鼠禁食 12 h, 腹腔注射 4% 戊巴比妥钠 (1.0 ml/kg) 麻醉, 立即取颈动脉置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h。经梯度酒精脱水、二甲苯透明、常规石蜡包埋, 备用。标本 5 μm 厚度连续切片, 常规 HE 染色, 中性树胶封片, 光镜下观察。利用 Quantiment 520 型计算机图像分析仪分别测量血管内膜和中膜横断面的面积, 并计算内膜、中膜面积比。

2.2.2 血清 MMP-9、TIMP-1 水平测定 于给药后第 6 周末, 各组大鼠禁食 12 h, 断尾取血, 血样于

3000 r/min 离心 10 min, 分离血清保存于 -20℃。采用酶联免疫法 (ELISA) 检测血清 MMP-9 与 TIMP-1 的浓度, 实验步骤严格按照试剂盒说明书操作。

2.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计学软件处理数据, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠颈动脉组织病理学情况

图 1 示, 空白组血管内膜无增厚, 内皮细胞紧贴弹力纤维层, 弹力纤维层完整, 中膜平滑肌细胞核呈梭形; 模型组血管内膜明显增厚, 泡沫样细胞堆积, 弹力纤维层不同程度破坏、断裂; 丹黄通脉方组血管内膜稍增厚, 可见少量泡沫样细胞形成, 弹力纤维层稍紊乱, 程度较模型组轻。表明颈动脉粥样硬化模型制作成功, 丹黄通脉方组具有干预颈动脉粥样硬化的作用。

3.2 各组大鼠颈动脉内膜、中膜面积比比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组和丹黄通脉方组 I/M 均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丹黄通脉方组大鼠 I/M 明显降低 ($P < 0.01$), 提示丹黄通脉方能明显抑制模型大鼠颈动脉新生内膜的增殖。

表 1 各组大鼠颈 I/M 及血清 MMP-9、TIMP-1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	I/M	MMP-9 (ng/ml)	TIMP-1 (ng/ml)
空白组	10	0	15.12 ± 4.61	1.86 ± 0.53
模型组	9	1.73 ± 0.21*	49.02 ± 1.08*	4.83 ± 2.87*
丹黄通脉方组	9	0.68 ± 0.11*△△	32.61 ± 8.19*△	5.96 ± 3.55*

注: I/M, 颈动脉内膜、中膜面积比; MMP-9, 基质金属蛋白酶 9; TIMP-1, 基质金属蛋白酶抑制剂 1; 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

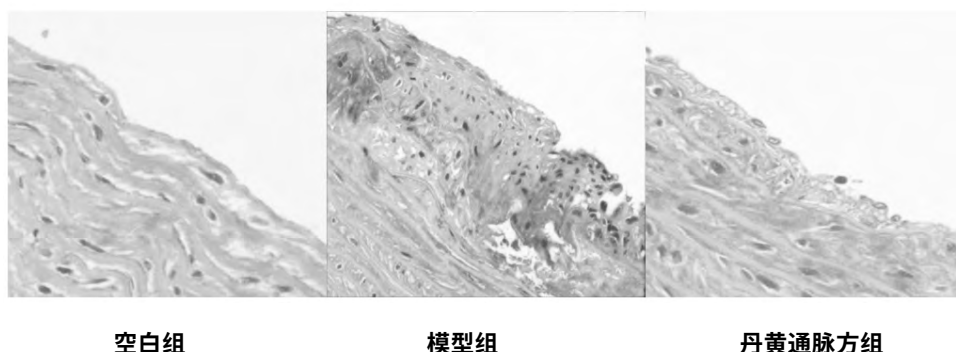


图 1 各组大鼠颈动脉 HE 染色图 (×200)

3.3 各组大鼠血清 MMP-9、TIMP-1 水平比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组及丹黄通脉方组大鼠血清 MMP-9、TIMP-1 水平均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 丹黄通脉方组 MMP-9 水平明显降低 ($P < 0.05$), TIMP-1 水平无明显变化 ($P > 0.05$)。

4 讨论

颈动脉粥样硬化易损斑块的破裂是急性脑血管事件发生的主要病因之一, 稳定斑块、预防斑块破裂具有重要的意义。MMPs 是一组同源、 Ca^{2+} 和 Zn^{2+} 活性依赖的中性蛋白酶家族, 其中 MMP-9 具有广泛的溶解细胞外基质的作用, 可使斑块表面纤维帽的完整性遭到破坏, 是造成斑块破裂的主要内在因素^[8-10]。研究表明, MMP-9 基因缺失能够减少血管平滑肌向内膜的迁移和增殖, 有效抑制血管重塑, 减轻动脉粥样硬化及再狭窄程度^[11-12]。

基质金属蛋白酶组织抑制剂 (TIMPs) 是 MMPs 的内源性抑制物, 不同的 TIMP 对 MMPs 成员有特异的抑制作用; TIMP-1 优先与 MMP-9 特异性结合, 形成可溶性非共价复合物而发挥其抑制作用^[13]。TIMP-1 能有效抑制 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块的进展, 减少斑块破裂的风险, 起到稳定斑块的作用^[14]。MMP-9 与 TIMP-1 之间的平衡共同调节细胞外基质的降解与合成, 血清 MMP-9、MMP-9/TIMP-1 可进一步反映斑块的易损性^[15]。

中医学认为, 颈动脉粥样硬化病位在血脉, 瘀血停聚, 气血运行受阻, 日久成“毒”, 损伤脉络, 进而阻塞脉管, 形成粥样硬化斑块, “瘀血”“毒邪”贯穿于该病的始末^[16]。丹黄通脉方由丹参、黄连、葛根、三七组成, 丹参活血化瘀, 黄连清热解毒, 两药配伍祛瘀血, 解瘀毒, 佐以葛根通利血脉, 三七活血消斑, 全方共奏活血解毒、消斑通脉的功效。现代药理学研究表明, 丹参及其有效成分具有减轻动脉硬化斑块的作用^[17]。丹参、三七等活血中药能够减少斑块脂质中心面积, 从而稳定斑块^[18]。黄连提取物可明显改善动脉粥样硬化斑块内胶原类型, 调整斑块内 MMP-9/TIMP-1, 从而促进斑块稳定^[19]。葛根可抑制单核巨噬细胞 MMP-9 的表达及其活性, 在一定程度上具有稳定斑块的作用^[20]。

本研究结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠血清 MMP-9 水平升高, 组织病理切片示血管内膜明显增厚, 泡沫样细胞堆积, 弹力纤维层不同程度

破坏、断裂, 表明大鼠颈动脉粥样硬化模型建立。丹黄通脉方组大鼠 I/M 明显降低, MMP-9 水平降低 ($P < 0.05$), 组织病理切片示其血管内膜稍增厚, 可见少量泡沫样细胞形成, 弹力纤维层稍紊乱, 程度较模型组轻。以上实验结果显示, 丹黄通脉方可抑制模型大鼠颈动脉新生内膜的增殖, 下调血清 MMP-9 水平, 改善颈动脉粥样硬化和稳定斑块。本研究初步证实了丹黄通脉方能够稳定易损斑块, 今后尚应从药物的剂量依赖性更深层验证丹黄通脉方对动脉粥样硬化的改善作用。

参考文献

- [1] DASKALOPOULOU SS, DASKALOPOULOS ME, PERREA D, et al. Carotid artery atherosclerosis: what is the evidence for drug action? [J]. Curr Pharm Des, 2007, 13 (11): 1141-1159.
- [2] GALIS ZS, KHATRI JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly [J]. Circ Res, 2002, 90(3): 251-262.
- [3] NEWBY AC. Matrix metalloproteinases regulate migration, proliferation, and death of vascular smooth muscle cells by degrading matrix and non-matrix substrates [J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(3): 614-624.
- [4] 王永刚, 齐婧, 郑刚, 等. 丹黄通脉胶囊治疗颈动脉粥样硬化性狭窄的临床研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(4): 445-447.
- [5] 王永刚, 齐婧, 郑刚, 等. 丹黄通脉方对颈动脉粥样硬化性狭窄模型大鼠脑血流量的影响 [J]. 中医药导报, 2012, 18(10): 16-18.
- [6] 王永刚, 齐婧, 车红磊, 等. 丹黄通脉方对大鼠颈动脉粥样硬化性狭窄模型炎症反应的影响 [J]. 陕西中医学院学报, 2012, 35(5): 62-65.
- [7] 周红, 吴晓燕, 袁艺标, 等. 三种剂量维生素 D₃ 结合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型的比较 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(11): 995-998.
- [8] SENIOR RM, GRIFFIN GL, FLISZAR CJ, et al. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases [J]. J Biol Chem, 1991, 266(12): 7870-7875.
- [9] 陈文强, 黄小波, 王宁群, 等. 陈皮半夏对颈动脉硬化家兔血管细胞黏附分子-1 及基质金属蛋白酶-9 表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2013, 20(11): 34-36.
- [10] STINTZING S, HEUSCHMANN P, BARBERA L, et al. Overexpression of MMP9 and tissue factor in unstable carotid plaques associated with Chlamydia pneumoniae, inflammation, and apoptosis [J]. Ann Vasc Surg, 2005, 19(3): 310-319.
- [11] GALIS ZS, JOHNSON C, GODIN D, et al. Targeted dis-

- ruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling [J]. *Circ Res*, 2002, 91(9): 852-859.
- [2] JOHNSON C, GALIS ZS. Matrix metalloproteinase-2 and -9 differentially regulate smooth muscle cell migration and cell-mediated collagen organization [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(1): 54-60.
- [3] 陈合成, 杨金升. 基质金属蛋白酶-9 在脑缺血中的作用 [J]. *国际脑血管病杂志*, 2007, 15(2): 144-147.
- [4] ROUIS M, ADAMY C, DUVERGER N, et al. Adenovirus-mediated overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 reduces atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 1999, 100(5): 533-540.
- [5] 薛飞, 袁建新, 杨秀平. MMP-9、TIMP-1 与颈动脉粥样硬化斑块稳定性的研究 [J]. *中国老年学杂志*, 2008, 28(10): 922-924.
- [6] 齐婧, 王永刚, 郑刚. 颈动脉粥样硬化性狭窄中医证候调查分析 [J]. *陕西中医学院学报*, 2011, 34(6): 6-8.
- [7] XU S, LITTLE PJ, LAN T, et al. Tanshinone II-A attenuates and stabilizes atherosclerotic plaques in apolipoprotein-E knockout mice fed a high cholesterol diet [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 515(1/2): 72-79.
- [8] 文川, 徐浩, 黄后福, 等. 几种活血中药对 ApoE 缺陷小鼠动脉粥样硬化斑块的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(5): 864-867.
- [9] 周明学, 徐浩, 王绿娅, 等. 黄连提取物对动脉硬化小鼠斑块胶原类型及 MMP-9/TIMP-1 比值的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(24): 4614-4619.
- [10] 李东野, 汪自龙, 夏勇, 等. 体外冠心病单核源巨噬细胞分泌的基质金属蛋白酶-9、组织因子的临床意义及葛根素的干预作用 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2007, 27(8): 692-695.

Impact of *Danhuang Tongmai Decoction* (丹黄通脉方) on Serum Levels of Matrix Metalloproteinase 9 and Matrix Metallo-proteinase Inhibitor 1 in Rats with Carotid Artery Atherosclerosis

QI Jing^{1,2}, WANG Yonggang^{1,2}, ZHENG Gang^{1,2}, CHEN Minna^{1,2}, LUO Yu³, ZHONG Wei^{1,2}, SHANG Junping^{1,2}

(1. Institute of Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, 712000; 2. Second Affiliated Hospital to Shaanxi University of Chinese Medicine; 3. Yulin Hospital of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the impact of *Danhuang Tongmai Decoction* (丹黄通脉方) on carotid atherosclerotic plaque and the possible mechanism. **Methods** Thirty Sprague Dawley (SD) rats were randomized into a blank group, a model group and a *Danhuang Tongmai Decoction* group, 10 rats of each group. The model group and the *Danhuang Tongmai Decoction* group were established carotid artery atherosclerosis models by high fat compound feed and intraperitoneal injection of vitamin D3. After the models were successfully established, the *Danhuang Tongmai Decoction* group were given *Danhuang Tongmai Decoction* 10 ml/(kg · d) by gavage; the blank group and the model group were given equivalent distilled water, twice every day, for 6 weeks. Arteria carotis pathological morphological changes of rats in all groups were examined. The levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and matrix metallo-proteinase inhibitor 1 (TIMP-1) were detected. **Results** Observation under light microscope showed that the tunica intima in the model group was significantly thickened, with foam like cell accumulation, varying degrees of damage and fracture of elastic fiber layer. The tunica intima in the *Danhuang Tongmai Decoction* group was a little thickened, with a small amount of foam like cell form and slightly disorder of elastic fiber layer, which was less serious than those in the model group. Compared with that in the blank group, the ratio of carotid intima and tunica media (I/M), and levels of MMP-9 and TIMP-1 in the model group and the *Danhuang Tongmai Decoction* group increased ($P < 0.05$). Compared with that in the model group, I/M and serum levels of MMP-9 in the *Danhuang Tongmai Decoction* group decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Danhuang Tongmai Decoction* might down-regulate the level of MMP-9, which might be one of the mechanisms of improving carotid artery atherosclerosis and stabilizing plaque.

Keywords carotid artery atherosclerosis; *Danhuang Tongmai Decoction*; histomorphology; matrix metalloproteinase 9; matrix metallo-proteinase inhibitor 1

(收稿日期: 2016-04-28; 修回日期: 2016-07-25)

编辑: 王利芬