

活血、益气、化痰中药对 ApoE 基因敲除小鼠主动脉粥样硬化斑块稳定性的影响

周明学¹ 徐浩² 陈可冀³ 潘琳² 郭艳茹² 文川²

(1. 中国中医科学院 2005 级博士研究生, 北京市东城区东直门内南小街 16 号, 100700; 2. 中日友好医院
全国中西医结合心血管病中心、临床医学研究所中心实验室; 3. 中国中医科学院西苑医院心血管病中心)

[摘要] **目的** 以中药提取物为切入点, 观察中医不同治法对 ApoE 基因敲除 (ApoE^{-/-}) 小鼠主动脉斑块稳定性的影响。 **方法** 70 只 ApoE^{-/-} 小鼠高脂喂养 13 周, 随机分为活血组 (丹参酮)、益气组 (西洋参茎叶总皂苷)、化痰组 (瓜蒌提取物)、模型组、阳性对照组 (辛伐他汀)。予药物治疗 13 周后, 采用形态学方法, 利用易损指数综合评价药物对斑块稳定性的影响。 **结果** 与模型组比较, 3 个中药组小鼠斑块易损指数均有所降低, 纤维帽长度/斑块内膜比值均有所增加, 瓜蒌提取物组埋藏纤维帽数目显著减少。 **结论** 活血、益气、化痰中药有效部位均可通过改善斑块内部成分稳定斑块, 化痰中药瓜蒌提取物在减少斑块破裂次数方面可能更有优势, 其具体作用值得深入研究。

[关键词] 易损斑块; 动脉粥样硬化; 易损指数; 化痰; 活血; 益气

Effect of Herbs to Activate Blood, Reinforce Qi and Dissolve Phlegm on Atherosclerotic Plaque Stability in Aorta of ApoE-gene Knockout Mice

ZHOU Ming-xue¹, XU Hao², CHEN Ke-ji³, et al.

(1. China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700; 2. Department of National Integrative Medicine Center for Cardiovascular Disease, China-Japan Friendship Hospital; 3. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of different herbal extractives on vulnerable atherosclerotic plaque stability in the aortic roots of fat-fed ApoE knockout mice. **Methods** Sixty ApoE knockout mice were fed a high-fat diet for 13 weeks until the mature atherosclerotic plaques formed. Thereafter, they were randomized into five groups: activating blood circulation group (treated with tanshinone), reinforcing qi group (treated with panaxquinquefoliumsaponin), dissolving phlegm group (treated with snakegourd fruit extract), control group, positive control group (treated with simvastatin). The treatment lasted for 13 weeks. The morphological method and vulnerability index were used to evaluate comprehensively the effect on the vulnerable atherosclerotic plaque stability. **Results** Compared with the control group, the vulnerability indexes of 3 herb groups were decreased. There was significant difference in the ratio of the length of fibrous cap to plaque intima, and the number of buried caps in plaque of dissolving phlegm group (snakegourd fruit extract) was significantly decreased. **Conclusion** The herbal extractives with the effect of activating blood circulation, reinforcing Qi and dissolving phlegm can stabilize vulnerable plaque by changing plaque composition. The snakegourd fruit extract is more superior on reducing the frequency of plaque rupture, its concrete mechanism is worth further investigating.

Key Words Vulnerable plaque; Atherosclerosis; Vulnerability index; Dissolving phlegm; Activating blood; Reinforcing qi

动脉粥样硬化 (AS) 易损斑块的破裂合并血栓形成是造成心血管急性临床事件的重要病理基础^[1]。大量研究表明, 斑块的稳定性主要取决于斑块的内部成分^[2], 而与斑块的大小、多少、位置及其所导致的管腔狭窄程度无关。活血、益气、化痰是临床上中医治疗冠心病的常用治法, 这三种治法的代表性药物对 AS 斑块稳定性的作用差异少见报道, 为此, 我们拟从形态学角度观察活血 (丹参酮)、益气 (西洋参茎叶总皂苷)、化痰 (瓜蒌提取物) 中药提取物对 ApoE 基因敲除小鼠 AS

斑块稳定性的影响。

1 材料

1.1 动物

6~8 周龄 ApoE 基因敲除小鼠 [品系 C57BL/6J, 北京大学实验动物中心自美国 Jackson 实验室引进并培育, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2002-0001] 60 只, 均为雄性, 体重 18~20g, 饲养条件为 2 级, 室温保持在 22~24℃, 相对湿度 50%, 光照时间 7:00~19:00。

1.2 药物与试剂

瓜蒌提取物由西安奥晶科技发展有限公司提供,

批号为 051019, 丹参酮胶囊由河北兴隆希力药业有限公司提供, 批号为 20050616, 心悦胶囊(即西洋参茎叶总皂苷)由吉林省集安益盛药业股份有限公司提供, 批号为 20050330, 辛伐他汀(商品名舒降之)由杭州默沙东制药有限公司出品, 批号为 P1196; 小鼠一抗 α actin, 购自 Neo Markers 公司; 二抗为通用型二抗, 购自 Dako 公司

1.3 仪器与软件

日本 Olympus BM-2 和 B×51 光学显微镜; 美国 Image-Pro Plus Version 5.0 (IPP) 图像分析软件。

2 方法

2.1 动物模型的建立

给小鼠饲以含脂肪 21% (wt/wt)、胆固醇 0.15% (wt/wt) 的高脂饲料^[3](⁶⁰Co γ 灭菌照射处理), 13 周后, 随机处死 4 只, 取主动脉根部, HE 染色观察基础 AS 硬化程度, 随机分组后再继续喂养 13 周, 并同时给予药物治疗。

2.2 动物分组及给药方法

确定 AS 形成后, 其余小鼠随机分为 6 组: 模型组、辛伐他汀组、正常组、瓜蒌提取物组、丹参酮组、西洋参总皂苷组, 每组各 11 只。根据成人每日用药临床推荐的常用剂量: 辛伐他汀组 0.0001 g/kg、瓜蒌提取物组 0.5 g/kg、丹参酮组 0.067 g/kg、西洋参总皂苷组 0.03 g/kg。按体重系数比折算成小鼠用量^[4]: 辛伐他汀组 9.01 mg/kg、瓜蒌提取物组 4.505 g/kg、丹参酮组 0.60 g/kg、西洋参总皂苷组 0.27 g/kg。药物溶于蒸馏水, 灌胃给药, 每日 1 次, 继续喂养 13 周。处死全部小鼠, 无菌条件下取出心脏及主动脉, 10% 甲醛固定。

2.3 标本处理

给药 13 周后动物处死, 无菌条件下取出心脏和主动脉, 10% 甲醛固定, 脱水, 常规石蜡包埋, 小鼠心底部横断面连续切片。按 Suzuki 等^[5]的方法, 每只小鼠的主动脉根部取 4 个相同的切面, 分别是: (1) 升主动脉最近端横截面, 切面形态呈圆形; (2) 主动脉瓣附着部位, 并有冠状动脉开口; (3) 主动脉瓣起始横截面; (4) 主动脉瓣完全出现并汇合在一起。每隔 100 μ m 连续取 6 张切片, 切片厚 5 μ m, 相邻的 3 个切面分别进行 HE 染色、Movat 染色和 α actin 组化染色。

2.4 特殊病理染色

改良的 Movat 五色套染法参考文献[6]并略加改进, 最终的染色结果为: 细胞核及弹力纤维—黑色; 基质和黏蛋白—蓝色; 胶原纤维—黄色; 平滑肌—红色; 泡沫细胞—淡紫色。

2.5 α actin 组化染色

防脱处理的切片脱蜡至水, 0.3% H₂O₂ 室温 15 分钟灭活内源性过氧化物酶; 滴加一抗(1:300 稀释) 4℃ 过夜; 滴加通用型二抗, 室温孵育 1~2 小时; TAB 显色。

2.6 检测指标

HE 染色主要观察斑块内细胞外脂质成分(主要是胆固醇结晶和胆固醇酯), Movat 染色主要观察斑块内泡沫细胞、胶原成分以及纤维帽埋藏情况。埋藏纤维帽的特点是富含平滑肌性成分和弹性蛋白成分, 并通常有大量的泡沫细胞覆盖^[7]。采用美国 IPP 5.0 图像分析软件测量并计算细胞外脂质、泡沫细胞、胶原成分各自占斑块面积的百分比, 埋藏纤维帽数目以及纤维帽长度/斑块内膜比值, 并用免疫组化染色半定量观察斑块内平滑肌细胞的阳性面积, 最后采用易损指数^[8](细胞外脂质成分+泡沫细胞/平滑肌细胞+胶原成分)综合评价药物对小鼠主动脉斑块稳定性的影响。计算时每个样本取 4 个切面的平均值。

2.7 统计学方法

所有计量数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 统计学软件组间比较用单因素方差分析, 对于组间斑块内埋藏纤维帽数目(不连续数据)比较, 采用 Kruskal-Wallis H 检验和 Mann-Whitney 检验。

3 结果

3.1 模型组小鼠主动脉 AS 病理结构变化的观察

HE 染色显示, 模型组主动脉根部可看到明显的 AS 斑块, 表面有大量泡沫细胞覆盖, 胆固醇酯及胆固醇结晶明显增多, 纤维帽较薄, 脂质侵蚀, 钙化, 外膜有大量炎细胞浸润, 显示出易损斑块特征。Movat 染色显示模型组斑块内胶原成分明显减少, 可见大量的淡紫色巨噬细胞源性泡沫细胞, 部分斑块纤维帽被泡沫细胞埋藏, 血管中膜结构严重破坏。血管扩张性重塑, 主动脉内膜弥漫性增厚。

3.2 各组药物对 ApoE 基因敲除小鼠主动脉易损斑块内部成分的影响

在临床推荐剂量上, 给药 13 周后各药物组斑块内细胞外脂质成分均明显减少, 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中以西洋参总皂苷组减少最为显著($P < 0.01$); 各给药组斑块内泡沫细胞成分与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。而对于斑块内纤维肌性成分, 各组斑块内胶原纤维成分均明显增加, 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 以瓜蒌提取物组增加最为

显著;而各给药组斑块内平滑肌细胞成分与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 1, 2。

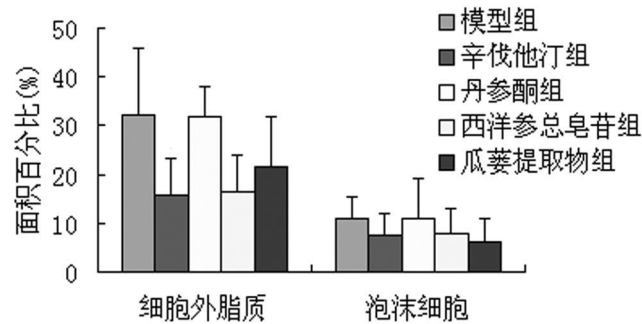


图1 给药后各组小鼠主动脉斑块内脂质成分面积的比较

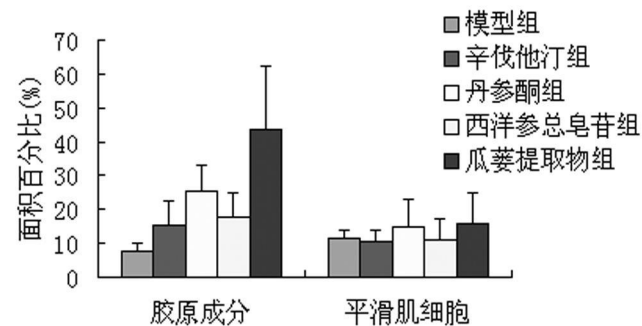


图2 给药后各组小鼠主动脉斑块内纤维肌性成分面积的比较

3.3 各组药物对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块纤维帽的影响

与模型组比较, 13 周后辛伐他汀组及瓜蒌提取物组、丹参酮组、西洋参总皂苷组的纤维帽与斑块内膜比值显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 瓜蒌提取物组的斑块内埋藏纤维帽数目与模型组比较明显减少($P<0.01$)。见附表。

附表 各组小鼠埋藏纤维帽的数目及纤维帽占斑块内膜比值的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	纤维帽长度/斑块内膜	埋藏纤维帽平均数目
模型组	11	0.48±0.15	0.46±0.34
辛伐他汀组	11	0.79±0.16**	0.14±0.24
丹参酮组	11	0.65±0.14*	0.36±0.38
西洋参总皂苷组	11	0.64±0.14*	0.19±0.21
瓜蒌提取物组	11	0.88±0.13**	0.06±0.11**

与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.4 对 各 组 药 物 ApoE 基 因 敲 除 小 鼠 动 脉 斑 块 稳 定 性 的 综 合 评 价

与模型组比较, 给药 13 周后, 丹参酮组、西洋参茎叶总皂苷组和瓜蒌提取物组的小鼠动脉粥样硬化斑块易损指数均有不同程度的降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 组间比较差异无统计学意义($P>0.05$); 见图 3。

4 讨论

大量研究表明, 斑块的稳定性对于防止斑块破裂及急性冠脉事件至关重要^[9,10]。而它主要取决于斑块

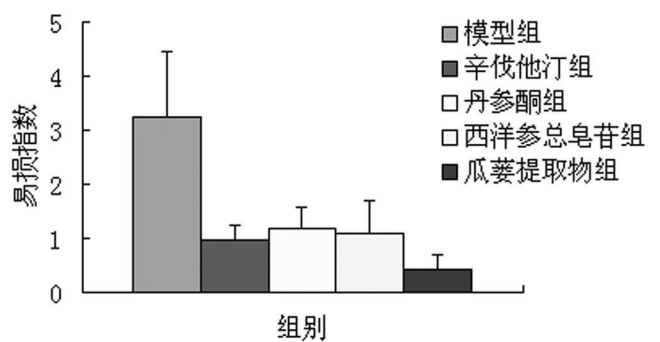


图3 给药后各组小鼠主动脉粥样硬化斑块易损指数的比较

内组织成分以及纤维帽的状态^[11]。巨噬细胞和泡沫细胞常出现在纤维帽破裂部位^[12,13], 二者分泌基质金属蛋白酶(MMPs)和 γ 干扰素。MMPs 可分解胶原纤维, γ 干扰素可抑制胶原合成, 促进平滑肌细胞凋亡, 最终使斑块纤维帽变薄。此外, 巨噬细胞吞噬脂质后转化成泡沫细胞, 而巨噬细胞源性泡沫细胞的不断聚集、坏死可使斑块内细胞外脂质不断增多, 脂质核心变大, 使斑块稳定性降低。因此, 将脂质成分(泡沫细胞和细胞外脂质)与纤维肌性成分(平滑肌细胞和胶原纤维)共同作为衡量斑块的“易损指数”, 可作为反映斑块易损性的更为客观、全面的评价指标。研究结果表明, 活血、益气、化痰中药有效成分丹参酮、西洋参茎叶总皂苷、瓜蒌提取物在临床推荐剂量上均可通过改善斑块内部成分来稳定易损斑块, 3 组药物主要是通过减少斑块内细胞外脂质成分和增加斑块内胶原成分来起到稳定易损 AS 斑块的作用, 作用强度有所不同, 差异无统计学意义。

斑块内埋藏的纤维帽可代表已愈合的斑块破裂。正如人的冠状动脉, 斑块的急性破裂可以愈合并将纤维帽埋藏^[14,15], 埋藏纤维帽常出现在斑块破裂发生相对频繁的部位, 并伴有纤维蛋白沉积, 而纤维蛋白沉积是斑块破裂的另一重要特征^[7]。所以埋藏纤维帽数目可作为评价斑块易损的一项指标。由于易损斑块纤维帽厚度不均, 且常常不足以覆盖斑块内膜, 所以纤维帽长度/斑块内膜长度比值, 可间接反映斑块纤维帽的修复能力。研究结果显示, 瓜蒌提取物、丹参酮、西洋参总皂苷均可增加纤维帽与斑块内膜比值, 但在减少斑块埋藏纤维帽数目方面, 瓜蒌提取物的作用表现地较为突出, 这说明在减少既往斑块破裂次数方面, 化痰中药组瓜蒌提取物表现出较强优势。

现代药理研究表明, 瓜蒌提取物、丹参酮、西洋参茎叶总皂苷均具有程度不同的扩张冠脉血管、保护缺血心肌、改善微循环、抗 AS、抗心律失常等作用^[16~18], 但它们是否对不稳定动脉粥样斑块具有干预作用还未见相关报道。本实验研究通过对比临床推荐剂量下的

活血、益气、豁痰中药有效成分丹参酮、西洋参茎叶总皂苷、瓜蒌提取物对 ApoE 基因敲除小鼠主 AS 斑块稳定性的作用,得出结论:无论是在改善易损斑块内部成分的作用方面,还是在修复斑块纤维帽的能力方面,上述 3 种中药有效成分均表现出较好的作用,其具体作用强度有所不同。化痰中药瓜蒌提取物在减少斑块破裂次数方面可能更有优势。在此基础上,深入研究活血、益气、化痰中药有效成分干预易损斑块的具体环节,进而优化配伍组合,对于进一步提高稳定斑块作用,减少临床急性心血管事件的发生无疑具有重要意义。

参考文献

[1]Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: part I. Circulation, 2003, 108(14):1664~1672.

[2]Ambrose JA, Martinez EE. A new Paradigm for plaque stabilization. Circulation. 2002, 105(16):2000~2004.

[3]Shah PK, Nilsson J, Kaul S, et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I (Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. Circulation, 1998, 97(8):780~785.

[4]徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2002:202~204.

[5]Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. Nature, 1997, 386(6622):292~296.

[6]李莉,翟同均,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):661.

[7]Johnson J, Carson K, Williams H, et al. Plaque rupture after short periods of fat feeding in the apolipoprotein E-knockout mouse: model characterization and effects of

pravastatin treatment. Circulation, 2005, 111(11):1422~1430.

[8]Shiomi M, Ito T, Hirouchi Y, et al. Fibromuscular cap composition is important for the stability of established atherosclerotic plaques in mature WHHL rabbits treated with statins. Atherosclerosis, 2001, 157(1):75~84.

[9]Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. Circulation, 1995, 91(11):2844~2850.

[10]Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. Circulation, 1996, 94(8):2013~2020.

[11]Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(10):1859~1867.

[12]van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, et al. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. Circulation, 1994, 89(1):36~44.

[13]Amento EP, Ehsani N, Palmer H, et al. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb, 1991, 11(5):1223~1230.

[14]Mann J, Davies MJ. Mechanisms of progression in native coronary artery disease: role of healed plaque disruption. Heart, 1999, 82(3):265~268.

[15]Burke AP, Kolodgie FD, Farb A, et al. Healed plaque ruptures and sudden coronary death. Circulation, 2001, 103(7):934~940.

[16]屠捷红,余菁,陈伟光. 瓜蒌的化学成分和药理作用研究概况. 中国药师,2004,18(7):121~124.

[17]吴杲,何招兵,吴汉斌. 丹参酮的药理作用研究进展. 现代中西医结合杂志,2005,14(10):1382~1385.

[18]王承龙,殷惠军,史大卓,等. 西洋参茎叶皂苷心血管药理研究概述. 中药新药与临床药理,2006,17(1):76~78.

(收稿日期:2007-10-16;修回日期:2008-06-30)

[编辑:李长今 叶 晨]

《世界中西医结合杂志》征订启事

《世界中西医结合杂志》(CN 11-5511/R, ISSN 1673-6613)是由中国科学技术协会主管,中华中医药学会主办的医学类科技期刊,面向国内外公开发行人。辟有专家论谈、名医经验、医史文献、实验研究、药物研究、临床研究、思路与方法、综述等栏目。本刊以国内外中医药、中西医结合临床、科研、教学人员为读者对象。主要报道中医及中西医结合在临床、科研等方面的经验和成果,探讨中西医结合的思路和方法,介绍相关领域的国内外进展,开展学术讨论。现已被《中国学术期刊综合评价数据库统计源》、《中国学术期刊(光盘版)》、《中国期刊网》、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《万方数据—数字化期刊群》、《中文科技期刊数据库》收录。

本刊为月刊,每期 80 页,每月末 28 日出版。2009 年每期定价 9 元。各地邮局均可订阅,邮发代号 80-538;国外向中国国际图书贸易总公司订阅,代号 M7968。

本刊地址:北京市朝阳区北四环东路 115 号院 6 号楼 109 室,邮编:100101,电话/传真:010-64822253,网址: <http://www.wjtcw.com>, E-mail: sjzxyjh@126.com。

编纂《中国中医特色诊疗技术》征文通知

在长期的医疗实践活动中,中医药工作者积累了丰富的防病治病经验,并且形成了一大批非手术、非药物的中医特色诊疗技术。这些特色诊疗技术经反复临床验证,具有疗效显著、操作规范、安全可靠、容易掌握、适于推广的特点,并且具有创伤小、毒副作用少、价格相对低廉的优势。为研究、推广中医特色诊疗技术,我们拟将汇编《中国中医特色诊疗技术》,现征稿如下。

中医各种特色诊疗技术(包含中药内服/外用、膏、丹、散、丸、针灸、推拿、理疗、足疗、刮痧、挂线等)的理论研究、临床研究、临床应用总结;专科(专病)中成熟的中医专科(专病)诊疗技术;中医各种特色诊疗技术在临床及保健养生等领域的作用及发展前景。

截文日期:2008 年 12 月 28 日。论文请寄:南京市商埠街 27 号,南京尚真医学技术研究中心学术部,邮编:210011。电子邮件: tougao@xyjw.com。电话:(025) 51522033、51502086。请注明“诊疗技术”字样,及附作者简历、电话。

欢迎致力于中医特色诊疗技术研究的专家、学者、同仁赐稿;录用论文将免费刊登在医学研究网 www.xyjw.com。