

· 方药研究 ·

四妙勇安汤对动脉粥样硬化模型兔氧化应激及炎症反应的影响

张军平¹ 许颖智² 李 明¹ 李良军² 彭 立² 张光银² 杨 萃² 周亚男²

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津市南开区鞍山西道314号, 300193; 2. 天津中医药大学)

[摘要] **目的** 探讨四妙勇安汤对动脉粥样硬化家兔的干预效果及作用机理。**方法** 36只日本雄性大耳白兔随机分为4组, 分别为正常对照组、模型组、四妙勇安组及辛伐他汀组。通过高脂饲料、免疫损伤结合经股动脉球囊拉伤建立动脉粥样硬化家兔模型, 四妙勇安组给予四妙勇安汤每次11.25g/kg 生药量灌胃, 每日2次; 辛伐他汀组给予辛伐他汀5mg/kg 灌胃, 每日1次; 正常对照组和模型组每日灌胃生理盐水20ml。于0、3、6、10周时测定各组家兔血超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、白细胞介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、单核细胞趋化因子(MCP-1)的含量及主动脉细胞核因子- κ (NF- κ)的表达。**结果** 与正常对照组比较, 模型组各时间点MDA、IL-1、TNF- α 、MCP-1水平显著增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), SOD与TNF- α 之间存在一定相关性, 四妙勇安组和辛伐他汀组在各时间点能够不同程度的调节MDA、IL-1、MCP-1、TNF- α 、MCP-1水平及动脉壁NF- κ 表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 四妙勇安汤能够抑制动脉粥样硬化家兔炎症反应及氧化应激, 增强兔动脉粥样硬化斑块的稳定性。

[关键词] 四妙勇安汤; 动脉粥样硬化; 氧化应激; 炎症反应

Effect of Simiao Yong'an Decoction on Oxidative Stress and Inflammation on Atherosclerosis Model Rabbits

ZHANG Junping¹, XU Yingzhi², LI Ming¹, LI Liangjun², PENG Li², ZHANG Guangyin², YANG Cui², ZHOU Yanan²

(1. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Simiao Yong'an Decoction (Decoction of four herbs for atherosclerosis) on rabbit atherosclerosis and its mechanism. **Methods** Thirty-six Japanese white rabbits were randomized into four groups: normal control group, model group, Simiao Yong'an group and simvastatin group. The models were made through high fat diet, immune injury combined with femoral balloon bulging injury. Simiao Yong'an group was treated by Simiao Yong'an Decoction, raw medicine 11.25g/kg by gavage each time, twice a day; Simvastatin group was treated by simvastatin 5mg/kg by gavage each time, once a day; normal control group and model group were treated by normal saline by gavage, 20ml each day. In the 0, 3rd, 6th, and 10th week, the concentration of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), interleukin (IL-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and the expression of aortic nucleus factor- κ (NF- κ) were determined. **Results** Compared with those of the normal control group, the level of MDA, IL-1, TNF- α , MCP-1, and NF- κ of model group increased significantly at all time points ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and there was relativity between SOD and TNF- α . Simiao Yong'an group and simvastatin group could regulate MDA, IL-1, MCP-1, TNF- α and MCP-1 at all time points to different degrees and the expression of NF- κ in aorta wall ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Simiao Yong'an Decoction can prohibit inflammation reaction and oxidative stress of atherosclerosis rabbits, strengthening the stability of atherosclerosis plaque.

Key Words Simiao Yong'an Decoction (Decoction of four herbs for atherosclerosis); Atherosclerosis; Oxidative stress; Inflammation

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是冠脉事件及脑卒中等心脑血管事件的主要原因。在引起动脉粥样硬化的众多因素中, 高胆固醇血症、脂质过氧化、炎症反应等是重要的危险因素。中医认为在其痰瘀的病机基础上, 热毒在其发展过程中占有重要地位, 我们在临床治疗中加入清热解毒药后往往收效极佳^[1-2]。本研究基于对AS的血瘀热毒的病机认识, 运用具有滋阴活血解毒作用的四妙勇安汤对实验性AS兔模型进行

干预, 观察其疗效, 旨在进一步阐明其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级雄性日本大耳白兔36只(北京维通利华实验动物有限公司提供, SCXK京2007-0001), 体重(2.2±0.2)kg。

1.2 实验药物

四妙勇安汤水煎剂组成: 金银花30g, 玄参30g, 当归20g, 甘草10g, 购自天津中医药大学第一附属医院。汤液经过旋蒸仪旋蒸浓缩至2.25g/ml。辛伐他汀: 杭州

默沙东制药有限公司,批号07283。胎牛血清白蛋白。

1.3 主要试剂与仪器

超氧化物歧化酶(SOD,批号20080509)、丙二醛(MDA,批号20080416)试剂盒,均购自南京建成生物技术有限公司;白细胞介素-1(IL-1,批号 cat⁵R032)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α 、单核细胞趋化因子(MCP-1,批号5R030) ELISA 试剂盒,美国 RB 公司;细胞核因子- κ (NF- κ ,批号 Cat. #RB-1638-P0) 免疫组化试剂盒,美国 Chemicon 公司;200型半自动生化分析仪(荷兰威图公司);Olympus-BX40型生物显微镜(BX40,日本奥林巴斯公司)。

2 方法

2.1 动物分组

动物予普通饲料适应性饲养1周,然后采用计算机随机数字表法分为正常对照组6只,模型组10只,四妙勇安组10只,辛伐他汀组10只。均单笼饲养,饮水不限,自由摄食,每日每只予150g 饲料。

2.2 造模方法

采用高脂饮食加免疫损伤和球囊拉伤方法建立兔 AS 模型^[3],予普通饲料适应性喂养1周后给予高脂饲料每只配方:1%胆固醇+5%猪油+5%蛋黄+89%普通料) 100g/日(早),普通饲料50g/日(晚);第2周予胎牛血清白蛋白250mg ml⁻¹ kg⁻¹,经兔耳缘静脉注射;第4周行经股动脉球囊拉伤术。

2.3 给药方法

正常照组动物予普通饲料,每天灌胃生理盐水20ml;其他各组予以高脂饮食的同时,辛伐他汀组给予辛伐他汀每次5mg/kg 灌胃,每日1次,四妙勇安汤组给予四妙勇安汤每次11.25g(生药量)/kg 灌胃,每日2次。共9周,第10周取材。

2.4 观察指标及方法

2.4.1血清学指标检测 分别于实验开始0、3、6、10周进行采血,采血前禁食12h,然后经耳缘静脉抽取空腹血3ml,静置1h后3000r/min 离心10min,取血清-80℃冻存待用。SOD 采用黄嘌呤氧化酶法,MDA 用硫代巴比妥酸(TBA)法;IL-1、TNF- α 、MCP-1用 ELISA 方法检测,步骤严格按照说明书进行。

2.4.2 主动脉 NF- κ B 阳性细胞检测 石蜡包埋一次性切片多张,分别做 HE 染色和免疫组化,两种切片都是相邻的,HE 染色做病理分析的图片与免疫组化的分析图片来自同一部位,可相互对照。选取与病理图像分析所用图片相邻的切片用免疫组化方法检测,步骤:脱蜡,0.01mol PBS 洗3次,3%双氧水封闭,0.01mol PBS 洗3次,打孔液打孔10min,蒸馏水冲洗,0.01mol PBS 洗3次,微波枸橼酸热修复,冷却至室温,5%兔血清封

闭液封闭45min,4℃过夜,滴加一抗 NF- κ Bp65,4℃取出,复温20min,滴加二抗,37℃孵育,0.01mol PBS 洗3次,DAB 显色,苏木素复染,自来水冲洗,分化液分化,自来水冲洗,返蓝,中性树胶封片,显微镜下观察。每只动物选取3张切片,每张切片随机观察5个不同的高倍镜视野(10×40),计算阳性细胞的面积占内膜面积的百分比,取其平均值。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,相关性分析采用 Pearson 相关分析方法。

3 结果

3.1 各组兔血清 SOD、MDA 水平的比较

表1示,与正常对照组同时间点比较,模型组 SOD 水平在第3、10周时降低,MDA 水平在第3、6、10周时均增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组同时间点比较,四妙勇安组 MDA 水平在第3、6、10周时均低于模型组,辛伐他汀组 MDA 水平3、6周时水平亦低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表1 各组兔血清 SOD、MDA 含量在不同时间点的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	兔数	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
正常对照组	0 _w	6	290.27±25.65	3.46±0.86
	3 _w	6	289.16±50.76	2.71±0.38
	6 _w	6	283.05±26.21	4.09±1.45
	10 _w	6	264.74±27.51	4.23±1.44
模型组	0 _w	10	290.19±30.98	3.60±0.99
	3 _w	10	227.55±46.49*	5.30±2.15**
	6 _w	10	255.37±27.75	7.08±1.37*
	10 _w	10	194.97±48.28*	10.05±3.90*
辛伐他汀组	0 _w	10	290.68±30.98	4.54±0.98
	3 _w	10	221.54±56.28	3.64±0.85△
	6 _w	10	258.38±23.65	4.29±1.39△△
	10 _w	10	172.66±32.53	8.46±1.75
四妙勇安组	0 _w	10	320.24±27.95	3.65±1.01
	3 _w	10	234.49±32.01	3.33±0.79△△
	6 _w	10	270.97±44.81	5.13±1.33△
	10 _w	10	166.70±65.80	7.85±1.91△

注:与正常对照组同时间点比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组同时间点比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$

3.2 各组兔血清 IL-1、TNF- α 和 MCP-1水平的比较

表2示,与正常对照组同时间点比较,模型组、辛伐他汀组和四妙勇安组 IL-1、TNF- α 及 MCP-1水平随时间延长呈增长趋势,并且在3、6、10周时差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组同时间点比较,辛伐他汀组 IL-1水平在第3、6、10周时均降低,TNF- α 水平第6、10周时降低,MCP-1水平在3、10周时降低($P < 0.01$);四妙勇安组 IL-1水平3、6、10周时均降低,TNF- α 和 MCP-1水平在3、10周时降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表2 各组兔血清 IL-1、TNF- α 、MCP-1含量在不同时间点的比较(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	兔数	IL-1	TNF-α	MCP-1
正常对照组	0 _w	6	3280.03±190.42	2835.64±571.02	1286.18±418.03
	3 _w	6	3381.12±264.54	2831.59±391.17	1305.75±364.25
	6 _w	6	3217.24±275.80	3141.77±966.20	1548.60±496.12
	10 _w	6	3304.60±300.05	2706.71±814.72	1430.55±326.54
模型组	0 _w	10	3392.40±230.42	3306.55±702.51	1498.89±306.91
	3 _w	10	12460.26±609.06*	9089.76±650.13*	5956.40±841.16*
	6 _w	10	12286.80±1357.60*	9350.19±1636.48*	6190.07±833.92*
	10 _w	10	13684.78±728.52*	11340.77±822.19*	6739.29±518.97*
辛伐他汀组	0 _w	10	3512.45±290.53	3741.42±841.97	1329.77±347.68
	3 _w	10	11102.11±522.64*	7171.80±1843.26*	4830.32±480.04*△△
	6 _w	10	9066.85±632.28*△△	7122.04±1752.96*△△	6156.67±1277.11*
	10 _w	10	9392.86±471.36*△△	7547.16±1319.60*△△	3142.02±509.73*△△
四妙勇安组	0 _w	10	3312.37±233.17	3390.632±131.77	1435.20±282.92
	3 _w	10	11130.27±346.57*△△	5284.87±435.82*△△	5180.46±238.63*△
	6 _w	10	8633.97±430.67*△△	8167.14±1357.68*	5850.79±437.73*
	10 _w	10	10677.57±417.50*△△	7879.09±1355.38*△△	4066.70±577.72*△△

注:与正常对照组同时时间点比较,* $P<0.01$;与模型组同时时间点比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

3.3 各组兔主动脉 NF-κB 阳性表达面积比较

正常对照组血管壁见少量 NF-κB 阳性表达,胞核内见少量不均匀的黄褐色沉淀物,阳性染色面积与内膜面积比是 0.012 ± 0.006 。模型组血管壁平滑肌细胞、内皮细胞的胞核有较多表达,在胞质内也有少量阳性表达,阳性染色面积与内膜面积比是 0.162 ± 0.046 ,与正常对照组比较,差异有统计学意义($P<0.01$)。辛伐他汀组与四妙勇安组在内皮细胞和平滑肌细胞有少量表达,阳性染色面积与内膜面积比分别是 0.107 ± 0.049 、 0.101 ± 0.0380 ,均低于模型组($P<0.01$),辛伐他汀组与四妙勇安组组间无统计学差异($P>0.05$)。

4 讨论

研究表明,在静止期的细胞中,NF-κB 二聚体与其抑制蛋白 IκBs 结合而处于非激活状态,当其激活后可调节160余种基因的表达,其中许多基因的表达产物如炎症因子及细胞因子等参与了动脉粥样硬化的过程^[4-5]。NF-κB 的不适当激活是引起炎症和氧化损伤的关键步骤,因而控制 NF-κB 的不适当激活是治疗 AS 的重要策略^[6]。在 AS 的发病过程中 SOD 活性下降,机体清除氧自由基能力下降,脂质过氧化的最终产物 MDA 增多。脂质过氧化产物可损伤血管内皮细胞,刺激 MCP-1 表达。MCP-1 趋化单核细胞黏附于内皮细胞,此过程中血细胞受多因素刺激被激活,表达分泌多种细胞因子,如 IL-1 和 TNF-α 诱导炎症细胞聚集,斑块内炎症反应增强;另一方面诱导内皮细胞增生及平滑肌细胞增生移行,最终导致内膜增厚,脂核增大,纤维帽变薄,从而促进 AS 的发生发展。

AS 的发病过程中所表现出脂质代谢紊乱、内皮功能受损、高凝状态、氧自由基的损伤等,其病机可认为是邪毒瘀阻,其瘀阻日久乃蕴结成热毒;感染、炎症

在一定程度直接反应了热毒的病理变化^[7];日久脏腑失调,形成血瘀热毒阴虚相互夹杂的病理状态,进而损伤脉络,促进 AS 发生发展。四妙勇安汤以滋阴活血、清热解毒并治为原则以清除 AS 机体的热毒瘀血。方中金银花清热解毒,玄参滋阴清热,当归活血和营,生甘草解毒、调诸药。全方共奏清热解毒、活血通络之功效。

实验表明,四妙勇安汤能够明显下调氧自由基激活转录调控子 NF-κB 的表达,减少 MDA 的生成,减轻脂质过氧化损伤,同时,还可以降低 IL-1、TNF-α、MCP-1 的表达。可见,四妙勇安汤具有抑制氧化应激反应及炎症反应的作用,其作用机制可能是通过抑制 NF-κB 激活实现的。

参考文献

[1]王振宇,刘杰,彭喜君.加味四妙勇安汤治疗冠心病50例[J].吉林中医药,2005,25(7):25.
[2]刘海涛.加味四妙勇安汤治疗冠心病60例疗效观察[J].甘肃中医,2005,18(7):14-15.
[3]张军平,许颖智,李良军,等.实验性动脉粥样硬化模型复合建模的方法及评价[J].中国比较医学杂志,2009,19(1):41-45.
[4]Collins T, Cybulsky MI. NF-kappa B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis[J]. J Clin Invest, 2001, 107(3): 255-284.
[5]Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-kappa B activity[J]. Annu Rev Immunol, 2000, 18(4): 621-663.
[6]崔华,何作云.干红葡萄酒对饥饿性兔动脉粥样硬化血管壁的影响[J].中华预防医学杂志,2004,38(2):103-106.
[7]王筠,张军平.动脉粥样硬化的中医分期论治初探[J].中医杂志,2006,47(7):541-542.

(收稿日期:2009-02-10;修回日期:2009-06-02)

[编辑:邓媛]