

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.06.019

清热涤痰解痉方对冠状动脉痉挛小鼠血清 ox-LDL、hs-CRP 及 ET-1 的影响

王微微¹, 郭双庚², 杜峰³, 齐建兴^{2*}

(1. 河北医科大学, 河北省石家庄市中山东路 361 号, 050017; 2. 河北省中医药研究院; 3. 石家庄市第一医院)

摘要 目的 观察清热涤痰解痉方对垂体后叶素诱发高脂血症小鼠冠状动脉痉挛的影响, 并探讨其可能的作用机制。方法 将 140 只 C57BL/6J 小鼠随机分为正常组、模型组、合心爽组、阿托伐他汀组和中药高、中、低剂量组, 每组 20 只。除正常组外, 其余各组均给予高脂饲料饲养 4 周。中药高、中、低剂量组分别给予清热涤痰解痉方颗粒剂 7.2、3.6、1.8 g/(kg·d), 合心爽组给予合心爽 0.04 g/(kg·d), 阿托伐他汀组给予阿托伐他汀钙片 0.013 g/(kg·d), 正常组和模型组予同体积 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液, 每日 1 次, 连续 4 周。末次给药后 1 h, 腹腔注射垂体后叶素注射液 60 U/kg 建立冠状动脉痉挛模型。记录注射前 10 min 和注射后 5、10、15 min 时点 II 导联心电图, 计算 T 波位移动值, 试验结束后检测血清氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL)、高敏 C 反应蛋白 (hs-CRP)、内皮素 1 (ET-1) 水平。结果 模型组腹腔注射垂体后叶素后 5、10、15 min 时, 小鼠心电图 T 波位移动值较正常组有明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 合心爽组、阿托伐他汀组和中药高、中、低剂量组在 5、10、15 min 时均能降低 T 波位移动值 ($P < 0.05$); 与阿托伐他汀组比较, 中药高、中剂量组在 5、10 min 时 T 波位移动值显著降低, 中药高剂量组在 15 min 时 T 波位移动值亦明显降低 ($P < 0.05$)。与正常组比较, 其余各组血清 ox-LDL、hs-CRP、ET-1 含量均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 中药高剂量和阿托伐他汀组 ox-LDL 含量明显降低, 各给药组 hs-CRP 含量均明显降低, 合心爽组和中药高剂量组 ET-1 含量明显降低 ($P < 0.05$)。结论 清热涤痰解痉方能有效缓解垂体后叶素诱发高脂血症小鼠冠状动脉痉挛, 其作用机制可能与降低血清 ox-LDL、hs-CRP、ET-1 水平有关。

关键词 清热涤痰解痉方; 冠状动脉痉挛; 高脂血症; 氧化型低密度脂蛋白; 高敏 C 反应蛋白; 内皮素 1

非冠状动脉狭窄因素同样可以导致冠状动脉痉挛引起心肌缺血, 冠状动脉痉挛不仅可以造成患者不稳定心绞痛、变异型心绞痛, 甚至可以造成急性心肌梗死、猝死等心血管事件^[1]。有报道认为, 内皮功能紊乱是冠状动脉痉挛的病理基础^[2], 高脂血症是内皮损伤的重要危险因素^[3], 尤其是氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL) 参与的脂质过氧化反应可直接导致血管内皮受损^[4]; 炎症反应也是内皮损伤的重要机制, 且可由低密度脂蛋白升高促使高敏 C 反应蛋白 (hs-CRP) 升高而诱发^[5]。清热涤痰解痉方为小陷胸汤加姜黄、川芎、蝉衣组成, 为我们临床治疗冠状动脉痉挛的经验方。本研究旨在通过建立实验性冠状动脉痉挛小鼠模型, 观察清热涤痰解痉方对冠状动脉痉挛小鼠的疗效, 并

检测血清 ox-LDL、hs-CRP、内皮素 1 (ET-1) 水平, 探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 140 只, 4~6 周龄, 体重 17~20 g, 购于北京华康实验动物研究所, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2014-0004。单笼饲养, 自由进食、饮水, 每天光照 12h 黑暗 12h, 温度 16~26℃, 相对湿度 40%~70%。

1.2 药物

清热涤痰解痉方组成: 清半夏 4 g (批号: 407383T)、黄连 2.5 g (批号: 408014T)、瓜蒌 5 g (批号: 405304T)、蝉蜕 1 g (批号: 408103T)、川芎 6.5 g (批号: 408305T)、姜黄 2.5 g (批号: 309192T), 中药配方颗粒购自广东一方制药有限公司。阿托伐他汀钙片: 20 mg/片, 大连辉瑞制药

* 通讯作者: qq0214.happy@163.com, 13833182675

有限公司, 批号: J06345; 合心爽 (盐酸地尔硫卓片): 30 mg/片, 天津田边制药有限公司, 批号: 1309074; 垂体后叶注射液: 0.5 ml, 南京新百药业有限公司, 批号: 140403; 羧甲基纤维素钠: 天津永大化学试剂开发中心, 批号: 20130418; 水合氯醛: 天津市科密欧化学试剂有限公司, 批号: 20140414。

1.3 主要试剂与仪器

小鼠 ox-LDL 试剂盒 (批号: L141211367)、hs-CRP 试剂盒 (批号: L150119487)、ET-1 试剂盒 (批号: L150119492), 南京建成生物工程研究所。XDH-B 型心电图机: 上海医用电子仪器厂; WellscanMK3 型全自动酶标仪: 芬兰 Lab Systems Dragon; PowerLab 生理记录仪: 埃德仪器国际贸易 (上海) 有限公司; 7080 型全自动生化分析仪, 日本日立公司。

1.4 动物分组及模型复制

140 只小鼠按体重区组随机法分为正常组、模型组、合心爽组、阿托伐他汀组和中药高、中、低剂量组, 每组 20 只。除正常组外, 其余各组均给予高脂饲料 (热量组成: 碳水化合物 20.1%, 脂肪 59.8%, 蛋白质 20.1%) 饲养 4 周。中药高、中、低剂量组分别给予清热涤痰解痉方颗粒剂 7.2、3.6、1.8 g/ (kg · d), 合心爽组给予合心爽 0.04 g/ (kg · d), 阿托伐他汀组给予阿托伐他汀钙片 0.013 g/ (kg · d), 正常组和模型组予同体积 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃, 每日 1 次, 连续 4 周。末次给药后 1 h, 除正常组腹腔注射生理盐水外, 其余各组均按文献 [6] 腹腔注射垂体后叶素注射液 (60 U/kg) 制造高脂血症小鼠冠状动脉痉挛模型。

1.5 观察指标及检测方法

1.5.1 心电图检查 每组各取 10 只小鼠, 以

10% 水合氯醛行腹腔麻醉 (5 ml/100 g), 仰卧固定于操作台上, 将 4 个针形电极按规定位置分别插入四肢皮下, 检查记录注射垂体后叶素注射液前 10 min 和注射后 5、10、15 min 时点 II 导联心电图, 计算注射垂体后叶素后不同时间点心电图 T 波峰值与注射前的 T 波峰值的差值, 即 T 波位移值。

1.5.2 血清 ox-LDL、hs-CRP、ET-1 检测 实验末, 禁食 12 h, 剩余 10 只小鼠摘眼球取血, 室温放置 1 h 左右, 4℃、3500 r/min 离心 10 min, 分装血清, -20℃ 冰箱保存。采用 ELISA 法检测血清 ox-LDL、hs-CRP、ET-1 水平, 实验操作严格按试剂盒说明书进行。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 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, 两两间比较采用 LSD 法检验。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间点心电图 T 波位移值比较

表 1 示, 模型组小鼠腹腔注射垂体后叶素后 5、10、15 min 时, 小鼠心电图 T 波位移值较正常组有明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 合心爽组、阿托伐他汀组和中药高、中、低剂量组在注射后 5、10、15 min 时均能降低 T 波位移值 ($P < 0.05$), 并且合心爽组和中药高剂量组 T 波位移值与正常组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与合心爽组比较, 中药低剂量组和阿托伐他汀组在注射后 5、10、15 min 时 T 波位移值明显升高 ($P < 0.05$), 而中药高、中剂量组 T 波位移值差异不明显 ($P > 0.05$)。与阿托伐他汀组比较, 中药高、中剂量组在注射后 5、10 min 时 T 波位移值显著降低, 中药高剂量组在注射后 15 min 时 T 波位移值亦明显降低 ($P < 0.05$)。中药高、中、低各剂量组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠不同时间点 T 波位移值比较 (mV, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	注射后 5 min	注射后 10 min	注射后 15 min
正常组	10	0.022 ± 0.005	0.033 ± 0.011	0.056 ± 0.008
模型组	10	0.088 ± 0.012*	0.135 ± 0.031*	0.165 ± 0.015*
合心爽组	10	0.023 ± 0.004 ^Δ	0.043 ± 0.006 ^Δ	0.063 ± 0.004 ^Δ
阿托伐他汀组	10	0.031 ± 0.005* ^{Δ▲}	0.078 ± 0.012* ^{Δ▲}	0.129 ± 0.009* ^{Δ▲}
中药高剂量组	10	0.023 ± 0.006 ^{Δ#}	0.044 ± 0.005 ^{Δ#}	0.065 ± 0.009 ^{Δ#}
中药中剂量组	10	0.022 ± 0.002* ^{Δ#}	0.050 ± 0.006* ^{Δ#}	0.093 ± 0.022 ^Δ
中药低剂量组	10	0.032 ± 0.007* ^{Δ▲}	0.081 ± 0.003* ^{Δ▲}	0.119 ± 0.005* ^{Δ▲}

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与合心爽组比较, $\Delta P < 0.05$; 与阿托伐他汀组比较, $\#P < 0.05$

表 2 各组小鼠血清 ox-LDL、hs-CRP、ET-1 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ox-LDL ($\mu\text{g/dl}$)	hs-CRP ($\mu\text{g/ml}$)	ET-1 ($\mu\text{mol/L}$)
正常组	10	275.24 $\pm$ 51.78	0.44 $\pm$ 0.21	11.51 $\pm$ 2.43
模型组	10	510.02 $\pm$ 41.13 [*]	5.16 $\pm$ 0.92 ^{**}	43.16 $\pm$ 15.37 ^{**}
合心爽组	10	500.01 $\pm$ 116.97 [*]	4.70 $\pm$ 0.39 ^{**}	20.41 $\pm$ 7.24 ^Δ
阿托伐他汀组	10	411.09 $\pm$ 143.70 ^{*Δ▲}	3.39 $\pm$ 0.49 ^{**Δ▲}	33.52 $\pm$ 6.99 ^{**▲}
中药高剂量组	10	378.04 $\pm$ 69.64 ^{*Δ▲}	2.12 $\pm$ 0.33 ^{**Δ▲##}	21.57 $\pm$ 5.47 ^{**Δ##}
中药中剂量组	10	415.96 $\pm$ 99.60 [*]	3.36 $\pm$ 0.54 ^{**Δ▲}	26.98 $\pm$ 9.89 ^{**}
中药低剂量组	10	488.91 $\pm$ 90.2 ^{*#}	3.58 $\pm$ 0.41 ^{**Δ▲}	30.89 $\pm$ 9.12 ^{**}

注: ox-LDL, 氧化型低密度脂蛋白; hs-CRP, 高敏 C 反应蛋白; ET-1, 内皮素 1; 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, Δ $P < 0.05$; 与合心爽组比较, ▲ $P < 0.05$; 与阿托伐他汀组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.2 各组小鼠血清 ox-LDL、hs-CRP、ET-1 含量比较

表 2 示, 与正常组比较, 其余各组血清 ox-LDL、hs-CRP、ET-1 含量均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 中药高剂量和阿托伐他汀组 ox-LDL 含量明显降低, 阿托伐他汀组和中药高、中、低剂量组 hs-CRP 含量均明显降低, 合心爽组和中药高剂量组 ET-1 含量明显降低 ($P < 0.05$)。中药高剂量和阿托伐他汀组 ox-LDL 含量明显低于合心爽组 ($P < 0.05$), 中药高、中、低剂量组和阿托伐他汀组血清 hs-CRP 含量亦低于合心爽组 ($P < 0.05$), 阿托伐他汀组 ET-1 含量明显高于合心爽组 ($P < 0.05$)。与阿托伐他汀组比较, 中药低剂量组血清 ox-LDL 含量升高, 中药高剂量组血清 hs-CRP、ET-1 含量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

中医学认为, 冠状动脉痉挛依其临床表现当属“胸痹”“心痛”的范畴, 病因多与嗜食肥甘、烟酒过度、寒邪侵袭、情志失节等有关。病机多为痰热瘀阻在络, 络伤而拘, 不通则痛。《素问·刺热》曰“心热病者, 先不乐, 数日乃热, 热争则卒心痛。”清热涤痰解痉方为小陷胸汤化裁而成, 小陷胸汤原为《伤寒论》治疗痰热互结之小结胸证而设, 临床也常用来治疗胸痹^[7-8]。本方以黄连清热燥湿、泻火解毒为君药; 清半夏化痰开结为臣药; 佐以瓜蒌荡热涤痰、宽胸散结, 助清半夏祛痰之力; 姜黄、川芎活血逐瘀、通络止痛; 使以蝉衣搜风清热解痉, 缓解冠脉痉挛。诸药共奏清热涤痰、活血通络、解痉止痛之功。

本实验予小鼠饲喂高脂饮食后 4 周即可形成高脂血症, 且小鼠机体缺乏胆固醇转运蛋白, 其血清中 70% 的胆固醇都以高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 的形式存在, 不易形成动脉粥样硬化, 只适合单纯

的高脂血症研究^[9]。垂体后叶素可作用于血管加压素 V1 受体, 使血管尤其是毛细血管和小动脉收缩, 包括冠状动脉收缩, 从而使心肌缺血缺氧。垂体后叶素导致冠脉痉挛, 类似临床无明显大血管梗死的心绞痛或心肌梗死^[10]。冠状动脉痉挛可以发生在有狭窄的血管, 也可以发生在无狭窄的血管上^[11]。血管内皮功能紊乱作为冠状动脉痉挛的病理基础, 造成一氧化氮 (NO) 和 ET-1 的平衡破坏, 脂质过氧化反应、炎症反应是内皮损伤的重要机制^[12], 前者产生活性氧自由基, 形成慢性氧化应激, 一方面有直接细胞毒性或形成 ox-LDL, 并且 ox-LDL 被认为是冠状动脉痉挛的血浆标志物, 另一方面可消耗 NO, 使 ET-1 相对增加; 关于炎症反应, 有研究证实 C 反应蛋白能使内皮细胞 NO 的表达及分泌降低, 而 ET-1 的表达和分泌增加, 促进血管内皮功能障碍, 导致冠状动脉痉挛的发生^[9]。

本研究结果显示, 清热涤痰解痉方可显著对抗注射垂体后叶素注射液所致的 T 波位移, 缓解冠脉痉挛; 显著降低模型小鼠血清 ox-LDL 含量, 降低模型小鼠血清 hs-CRP 的表达, 降低模型小鼠血清 ET-1 水平, 改善血管内皮功能。因此, 清热涤痰解痉方缓解冠脉痉挛、改善心肌缺血的机制可能是通过降低血清 ox-LDL、hs-CRP 含量进而降低血清 ET-1 水平实现的。

参考文献

- [1] 张运, 陈文强. 缺血性心脏病发病机制的新观点 [J]. 中华心血管病杂志, 2014, 42(2): 94-97.
- [2] KAWANO H, OGAWA H. Endothelial function and coronary spastic angina [J]. Intern Med, 2005, 44(2): 91-99.
- [3] 林哲绚, 罗文鸿, 李慧. 血管内皮损伤危险因素研究进展 [J]. 汕头大学医学院学报, 2005, 18(1): 53-56.
- [4] 罗智敏, 陈伟强, 赵华云. 血清氧化型低密度脂蛋白及其自身抗体与冠状动脉痉挛的关系及调脂治疗对其影

- 响 [J]. 中国现代医生, 2013, 51(9): 31-32.
- [J] 吉宁飞, 吉佑华, 吉卫华, 等. 阿托伐他汀对高脂血症者高敏 C 反应蛋白的影响及其调脂疗效和安全性评估 [J]. 实用老年医学, 2009, 23(1): 19-22.
- [J] 孙萌, 周长征. 丹皮总苷对小鼠急性心肌缺血保护作用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2014, 16(1): 41-43.
- [J] 郭双庚. 小陷胸汤加味治疗难治性心脏病经验 [J]. 中医杂志, 2011, 52(21): 1866-1867.
- [J] 王付. 小陷胸汤方证思考与探索 [J]. 中医杂志, 2013, 54(6): 537-539.

- [J] 宁娜, 韩建军. 实验动物高脂血症模型研究进展 [J]. 亚太传统医药, 2013, 9(1): 66-69.
- [J] 辛玉虎. 在体动物心肌损伤模型述评 [J]. 心血管病学进展, 2009, 30(增 1): 38-41.
- [J] 陈纪林, 高润霖, 姚宝康, 等. 变异型心绞痛患者冠状动脉痉挛与血管狭窄病变的关系 [J]. 中华内科杂志, 1996, 35(9): 606-608.
- [J] 王晓俏. CRP 促血管内皮功能障碍及短期强化阿托伐他汀治疗的效应及机制研究 [J]. 广州: 南方医科大学, 2011.

Effects of *Qingre Ditan Jiejing Fang* (清热涤痰解痉方) on Serum ox-LDL, hs-CRP and ET-1 of Coronary Artery Spasm Mice

WANG Weiwei¹, GUO Shuanggeng², DU Feng³, QI Jianxing²

(1. Hebei Medical University, Hebei, 050017; 2. Chinese Medical Institute of Hebei Province; 3. The First Hospital of Shijiazhuang City)

ABSTRACT Objective To observe effects of *Qingre Ditan Jiejing Fang* (清热涤痰解痉方) on mice with hyperlipemia and coronary artery spasm induced by pituitrin and study the possible mechanism. **Methods** Totally 140 C57BL/6J mice were randomly divided into normal group, model group, diltiazem group, atorvastatin group and Chinese medicine high, medium and low dose group, with 20 mice in each group. Except for the normal group, the rest groups were given high-fat fodder to feed for 4 weeks. The Chinese medicine high, medium and low dose group were respectively given granules of *Qingre Ditan Jiejing Fang*, 7.2, 3.6, 1.8 g/(kg · d). The diltiazem group was given diltiazem, 0.04 g/(kg · d). The atorvastatin group was given atorvastatin calcium tablet, 0.013 g/(kg · d). The normal group and the model group were given 0.5% sodium carboxymethyl cellulose solution with same volume, once a day for four weeks. One hour after the last given treatment, the mice were given intraperitoneal injection with pituitrin 60 U/kg to establish model of coronary artery spasm. The researchers recorded II-lead electrocardiogram at the time that 10 min before and 5, 10, 15 min after injection and counted displacement of T wave. The researchers detected level of serum oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and endothelin-1 (ET-1) after test. **Results** At the time that 5, 10, 15 min after intraperitoneal injection with pituitrin, in the model group, displacement of T wave in electrocardiogram significantly increased compared with the normal group ($P < 0.05$); Compared with the model group, the diltiazem group, the atorvastatin group and the Chinese medicine high, medium and low dose group at above three time all can lower displacement of T wave ($P < 0.05$); Compared with the atorvastatin group, displacement of T wave significantly decreased in the Chinese medicine high and medium dose group at the 5, 10 min and the Chinese medicine high dose group at the 15 min ($P < 0.05$). Compared with the normal group, serum ox-LDL, hs-CRP, ET-1 in the rest groups significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group, ox-LDL in the Chinese medicine high dose group and the atorvastatin group significantly decreased, hs-CRP in each group that been given medicines significantly decreased and ET-1 in the diltiazem group and the Chinese medicine high dose group significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** *Qingre Ditan Jiejing Fang* may effectively relieve pituitrin inducing coronary artery spasm of mice with hyperlipemia and its mechanism may be related to lowering serum ox-LDL, hs-CRP and ET-1.

Keywords *Qingre Ditan Jiejing Fang* (清热涤痰解痉方); coronary artery spasm; hyperlipemia; oxidized low density lipoprotein; high-sensitivity C-reactive protein; endothelin-1

(收稿日期: 2015-06-10; 修回日期: 2015-10-31)

编辑: 邓 媛