

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2000)-04-0302-03

四逆汤抗实验性动脉粥样硬化的作用及其机制

黄河清, 吴伟康¹, 程超²

(广东省第二中医院内科, 广东省广州市 510095; 中山医科大学

1. 中西医结合研究所, 2. 附属第三医院)

[关键词] 动脉粥样硬化; 脂质/代谢; 一氧化氮; 内皮素; 脂质过氧化物

[摘要] 为探讨四逆汤抗实验性动脉粥样硬化的作用及其可能机制, 运用图像分析法测定主动脉内膜脂质斑块面积百分比, 脂代谢指标分别运用酶动力学法、一步法、公式计算法、免疫透射比浊法等方法测定, 血清一氧化氮及血浆内皮素分别用酶法及放射免疫法检测, 血浆超氧化物歧化酶与丙二醛分别运用微量快速测定法、改良的八木国夫法测定。结果发现, 四逆汤可明显缩小主动脉内膜脂质斑块面积, 降低血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、载脂蛋白 B 及血浆内皮素和丙二醛浓度, 提高血清一氧化氮水平、载脂蛋白 A 含量与血浆超氧化物歧化酶活性, 四逆汤高剂量组效果为佳。结果提示, 四逆汤具有较好的抗实验性动脉粥样硬化作用, 其作用机制与调节脂代谢、抗脂质过氧化损伤及保护血管内皮细胞功能等有关。

[中图分类号] R285.6

[文献标识码] A

Effect of Anti- Atherosclerosis of Sini Decoction and its Mechanism

HUANG He- Qing, WU Wei- Kang, and CHENG Chao

(Secondly Chinese Medical Science Hospital of Guang dong Province, Guangzhou 510095, China)

MeSH Atherosclerosis; Lipid/ metabolism; Nitric Oxide; Endothelins; Lipid Peroxides

ABSTRACT Aim To observe the effect of Sini decoction on plaque area (PA), nitric oxide (NO), endothelin (ET), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) in experimental atherosclerosis rabbits and study the possible mechanism.

Methods Detect PA of aortic endothelium with image analysis method. Lipid metabolism with enzyme dynamics method, one-step method, formula method and immunization photoextinction in dividually. Serum NO and plasma ET with enzyme method and radioimmunoassay method in dividually. Plasma SOD and MDA with microcontent fast detecting method and modified Ba MuGuoFu method in dividually.

Results Sini decoction can diminish lipid plaque area of aortic endothelium, reduce total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDLC), apolipoprotein B (apo B) and plasma ET, MDA, improve serum NO, apolipoprotein A (apo A) and plasma SOD content. Sini-high-dose group has the best effect in this experiment, presenting with dose-effect dependent relationship.

Conclusions Sini decoction has good effect against atherosclerosis, the possible mechanism maybe related to regulation of lipid metabolism and clearance of free radical oxygen and protection of vascular endothelium.

既往研究证实, 传统复方中药四逆汤具有扩张冠状动脉血管, 清除缺血心肌的氧自由基, 从代谢、机能及形态等方面对缺血心肌产生明显的保护作用^[1~3]。为了进一步研究该方对心血管系统的作用, 我们复制家兔动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)模型, 观察四逆汤对家兔脂代谢及血清一氧化氮(nitric oxide, NO)、血浆内皮素(endothelin, ET)、超

氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)等含量与活性的影响, 旨在探讨四逆汤抗As的作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

日本大耳白兔 32 只, 5~6 月龄, 体重 1.5~2 kg, 雌雄不拘, 购自中山医科大学实验动物中心。

1.2 药物及试剂

四逆汤由熟附片、干姜、炙甘草组成, 剂量比为 5:2:2, 由宏远制药有限公司制成粉末装胶囊, 每粒含生药 3 g。胆固醇为进口分装, 每瓶 100 g, 由广州

[基金项目] 中国博士后科学基金资助(项目编号 199917)

[作者简介] 黄河清, 男, 1965 年 1 月出生, 湖北十堰人, 中西医结合心血管内科专业博士研究生, 副教授。从事心血管内科临床与科研工作, 承担和参与国家自然科学基金等各类课题 7 项, 在国内外期刊发表学术论文 56 篇, 出版学术著作 3 本。

南方化玻公司提供。

1.3 模型建立与分组

将兔随机分为四组: 正常对照组喂饲基础饲料; ④模型组喂饲含 1% 胆固醇和 5% 猪油的高脂饲料; ④四逆汤中剂量组每兔每天给予含 2.1 g/kg 生药的四逆汤粉末制剂, 并混合于与模型组同条件的高脂饲料中喂饲; 四逆汤高剂量组每兔每天给予含 4.2 g/kg 生药的四逆汤粉末制剂, 并混合于与模型组同条件的高脂饲料中喂饲。后三组均在每日先将造模药物或造模药物与四逆汤制剂先拌于约 50 g 基础饲料中喂饲, 待食完后再补足基础饲料。各动物给食一般限制在 135~150 g/d。分笼饲养, 自由饮水。实验满 10 周时, 取血并处死各组动物, 取主动脉标本作形态学检查, 以证实模型成功。

1.4 观察指标

取各组动物的主动脉标本(从主动脉弓至腹主动脉骼前分支), 沿正中中线剪开, 除去内膜脂质, 生理盐水冲洗, 常规福尔马林固定, 用苏丹 IV 染色, 应用图像分析仪测定主动脉脂质斑块面积 (plaque area, PA) 百分比。血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 与血清甘油三酯 (triglyceride, TG) 测定采用酶动力学法, 血清高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 测定采用一步法, 血清低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)

按公式 $[TC - (0.54 \times TG + HDLC)]$ 计算, 血清载脂蛋白 A (apolipoprotein A, apo A) 与载脂蛋白 B (apolipoprotein B, apo B) 测定采用免疫透射比浊法, 血清 NO 水平测定采用酶法, 血浆内皮素浓度测定采用放射免疫法, 血浆 SOD 活性测定采用微量快速测定法, 血浆 MDA 含量测定采用改良的八木国夫法。

1.5 统计学方法

数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组均数比较采用单因素方差分析法和直线回归等。

2 结果

2.1 主动脉斑块面积

对照组主动脉斑块面积为 0, 模型组为 68% \pm 13%, 四逆汤中剂量组为 54% \pm 11%, 四逆汤高剂量组为 42% \pm 9%。模型组与四逆汤高剂量组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

2.2 血脂代谢指标

从表 1 (Table 1) 可知, 模型组 TC、TG、LDLC、载脂蛋白 B 均显著高于对照组, HDLC 虽有所升高, 但远低于 TC、LDLC 的升高幅度。四逆汤中剂量组和高剂量组 TC、TG、LDLC、载脂蛋白 B 显著低于模型组 ($P < 0.05$), 特别是四逆汤高剂量组疗效显著。同时四逆汤还能有效提高载脂蛋白 A 含量。

表 1 四逆汤对血清脂质代谢指标的影响

Table 1 The effect of Sini decoction on serum lipid metabolism ($\bar{x} \pm s$)

| Index | Control | Model | SD (M) | SD (H) |
|---------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| TC (mmol/L) | 0.59 \pm 0.16 | 47.31 \pm 11.49 ^a | 38.21 \pm 14.39 ^b | 23.13 \pm 6.78 ^{bc} |
| TG (mmol/L) | 0.75 \pm 0.24 | 3.61 \pm 2.66 ^a | 3.10 \pm 1.61 ^b | 1.10 \pm 0.59 ^{bc} |
| HDLC (mmol/L) | 0.23 \pm 0.21 | 2.58 \pm 1.13 | 2.24 \pm 0.55 | 1.65 \pm 0.36 ^b |
| LDLC (mmol/L) | 0.46 \pm 0.23 | 43.1 \pm 11.45 ^a | 34.58 \pm 14.07 ^b | 21.00 \pm 6.36 ^{bc} |
| Apo A (g/L) | 0.46 \pm 0.22 | 0.55 \pm 0.41 | 1.34 \pm 1.17 | 1.30 \pm 1.19 ^b |
| Apo B (g/L) | 0.015 \pm 0.01 | 1.04 \pm 0.88 ^a | 0.78 \pm 0.32 ^b | 0.23 \pm 0.19 ^{bc} |

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with model group; c: $P < 0.05$, compared with SD (M) group.

2.3 血清一氧化氮与血浆内皮素含量

从表 2 (Table 2) 可知, 模型组血清 NO 水平显著低于对照组, 而血浆内皮素浓度显著高于对照组。四逆汤中剂量组和高剂量组血清 NO 含量增加, 血浆内皮素含量降低, 以高剂量组疗效为佳。

2.4 血浆超氧化物歧化酶与丙二醛含量

从表 3 (Table 3) 可知, 模型组血浆 SOD 活性明显低于对照组, MDA 含量明显高于对照组, 四逆汤能有效提高血浆 SOD 活性, 降低 MDA 含量, 减轻脂质过氧化损伤。四逆汤中剂量组与高剂量组之间无

明显差异。

表 2 四逆汤对血清一氧化氮和血浆内皮素的影响

Table 2 The effect of Sini decoction on serum NO, plasma ET ($\bar{x} \pm s$)

| Index | NO (Hmol/L) | ET (ng/L) |
|---------|--------------------------------|---------------------------------|
| Control | 95.47 \pm 5.37 | 72.46 \pm 12.77 |
| Model | 68.45 \pm 6.41 ^a | 151.73 \pm 44.06 ^a |
| SD (M) | 77.70 \pm 1.18 ^b | 113.43 \pm 54.62 ^b |
| SD (H) | 86.82 \pm 3.53 ^{bc} | 94.62 \pm 35.09 ^b |

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with model group; c: $P < 0.05$, compared with SD (M) group.

表3 四逆汤对血浆超氧化物歧化酶和丙二醛的影响

Table 3 The effect of Sini Decoction on plasma SOD and MDA ($\bar{x} \pm s$)

| Index | SOD(u/L) | MDA(nmol/L) |
|---------|-----------------------------|---------------------------|
| Control | 200.53 ± 21.8 | 7.34 ± 1.01 |
| Model | 141.47 ± 28.98 ^a | 17.23 ± 3.27 ^a |
| SD (M) | 170.43 ± 6.25 ^b | 12.28 ± 0.71 ^b |
| SD (H) | 186.19 ± 9.06 ^b | 12.23 ± 3.97 ^b |

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with model group.

3 讨论

现已公认高脂血症是 As 病变的最重要的原因。TC、TG、LDLC 及作为 LDL 的主要载脂蛋白——载脂蛋白 B 被视为 As 的危害因子, HDLC 及作为 HDL 的主要载脂蛋白——载脂蛋白 A 是 As 的保护因子。近几年的多组二级干预试验表明, 降低血清胆固醇

及 LDL 水平能明显减缓肢体和冠状动脉粥样斑块的形成^[4, 5]。本实验显示, 高胆固醇饲料喂饲可导致家兔产生严重的 As; 四逆汤预防用药能够显著减少实验性家兔主动脉内膜的脂质斑块面积, 且呈一定的量效依赖关系。从实验结果看出, 四逆汤的抗 As 作用与降低 TC、TG、LDLC 及载脂蛋白 B 等脂代谢指标中 As 的危害因子、提高 As 的保护因子载脂蛋白 A 的含量有关。

血脂的变化与内分泌系统的调节有关, 下丘脑-垂体-靶腺轴功能的紊乱或减退是高脂血症的发病因素之一, 如甲状腺功能减退、肾病综合症等使血清 TC 等升高, 而温补肾阳法则可调节或激发下丘脑-垂体-靶腺轴功能, 降低血清 TC、LDLC 等浓度^[6, 7]。四逆汤是经典医著《伤寒论》记载的具有温肾回阳作用、治疗少阴虚寒证的主方, 其调节血脂作用可能与其激活下丘脑-垂体-靶腺轴功能及调节内分泌紊乱有关。

由完整血管内皮细胞合成、释放的内皮依赖性舒张因子 NO 具有扩张血管, 抑制多种血细胞对内皮的粘附和损伤, 抑制血小板活化聚集, 抗血管平滑肌细胞增殖等作用。而血管内皮收缩因子内皮素则有收缩血管, 促使血小板粘附聚集等作用。NO 和内皮素之间的平衡是体循环调节和局部血流灌注的主要决定因素^[8]。研究提示, As 发生时血循环中 NO 的基础释放和活性减低, 而血浆内皮素浓度则明显增高^[9]。本实验结果亦证实了这一点。这种 NO 与

内皮素间平衡的破坏是动脉内皮受损的显著特征, 并参与 As 进程, 促使 As 的发生、发展。本研究发 现, 四逆汤能够改善和保护家兔实验性 As 时血管内皮功能, 提高血清 NO 水平, 降低血浆内皮素浓度, 以调节 NO/内皮素的平衡。上述作用可能是四逆汤抗 As 的重要机理之一。

高胆固醇血症对动脉内皮的损伤是通过氧化损伤机制产生的, 高胆固醇血症增加动脉壁细胞内自由基释放系统的活性, 使氧自由基及其它活性氧成分释放增多, 动脉壁的脂质过氧化损伤导致大量的 LDL 被氧化; 另一方面, 高胆固醇血症又直接损伤动脉壁的抗氧化机能, 使动脉壁内的 SOD 活性降低, 导致脂质过氧化物清除障碍, 其分解代谢产物丙二醛含量增加, 加重局部血管的病理损伤和血管调节失常^[10]。本实验结果表明, 四逆汤能有效提高机体抗氧化酶活性, 降低脂质过氧化物的最终代谢产物的含量。提示四逆汤保护血管内皮细胞功能, 抗 As 的作用与清除氧自由基, 抗脂质过氧化损伤有关。

参考文献

- [1] 吴伟康, 侯 灿, 罗汉川, 等. 四逆汤保护缺血心肌功能的实验研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1995, 1 (3): 24- 25
- [2] 吴伟康, 杨 昆, 吴金浪, 等. 四逆汤保护小鼠缺血心肌超微结构的观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15 (特集): 22- 23
- [3] 吴伟康, 侯 灿, 罗汉川, 等. 四逆汤改善缺血心肌能量代谢的作用及机制探讨 [J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14 (6): 634- 635
- [4] 杨钧国. 冠状动脉粥样硬化的危险因素和高血脂 [M]. 见: 毛焕元, 杨心田. 心脏病学. 第一版, 北京: 人民卫生出版社, 1995, 919- 931
- [5] Kevin D. The Biology of the Artery wall in Atherogenesis [J]. Med Clin North America, 1994, 78 (1): 1- 5
- [6] 董 和. 补肾降脂药物作用的观察 [J]. 中西医结合杂志, 1991, 11 (1): 25- 27
- [7] 周文泉, 方 醉, 周 鸿. 高脂血症中西医结合研究进展 [J]. 中医杂志, 1992, 33 (8): 52- 54
- [8] Lemman A, Burnett JC. Inter and altered endothelium in regulation of vasomotion [J]. Circulation, 1992, 86 (6): 12- 19
- [9] Lefer AM, Ma XL. Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery endothelium [J]. Arterioscl and Thromb, 1993, 13: 771- 774
- [10] Keaney JF, Jr Vita JA. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection [J]. Progr Cardiovasc Disease, 1995, 38: 129- 148

(此文 2000- 03- 30 收到, 2000- 10- 24 修回)

(此文编辑 文玉珊)