

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-02-0112-03

## 补阳还五汤抗家兔动脉粥样硬化形成及机制

尚改萍<sup>1</sup>, 文志斌, 何晓凡, 汉建忠, 李俊成, 贺石林

(中南大学湘雅医学院生理学教研室, 湖南省长沙市 410078; 1. 长治医学院生理学教研室, 山西省长治市 046000)

[主题词] 补阳还五汤; 动脉粥样硬化; 一氧化氮; 内皮素; F 促凝活性

[摘要] 为了观察补阳还五汤抗动脉粥样硬化的作用及机制, 给予家兔高脂饮食和补阳还五汤, 用组织学方法观察动脉壁病理形态学改变, 并测定血清中总胆固醇、甘油三酯、内皮素、一氧化氮及 F 促凝活性水平。结果显示, 与高脂组相比, 补阳还五汤组血清总胆固醇和甘油三酯明显降低 ( $P < 0.01$ ); 血浆 F 促凝活性和一氧化氮水平明显降低 ( $P < 0.01$ ); 主动脉、腹主动脉和冠状动脉粥样斑块面积显著减少 ( $P < 0.01$ )。提示补阳还五汤具有抗动脉粥样硬化形成的作用, 其机制可能与降低血脂和 F 促凝活性有关。

[中图分类号] R972

[文献标识码] A

**“Buyang Huanwu Decoction” Inhibited Pathogenic Process of Atherosclerosis Induced by Cholesterol-rich Diet and Its Mechanism in Rabbits**SHANG Ga-Ping<sup>1</sup>, WEN Zhi-Bin, HE Xiao-Fan, HAN Jian-Zhong, LI Jun-Cheng, and HE Shi-Lin

(Department of Physiology, Xiangya Medical College, Central-Southern University, Changsha 410078; 1. Department of Physiology, Changzhi Medical College, Changzhi 046000, China)

[MeSH] Buyang Huanwu Decoction; Atherosclerosis; Nitric Oxide; Endothelin; Factor Procoagulant Activity

[ABSTRACT] **Aim** To determine whether the extract of Buyang huanwu decoction (BHD) inhibit the pathogenic progress of atherosclerosis induced by cholesterol-rich diet and to elucidate its mechanism in rabbits. **Methods** Three groups of rabbits received the following different diets for 9 weeks: ordinary diet (OD) group, model of atherosclerosis (MA) group (ordinary diet plus 1% cholesterol and 3.3% fat), and MA plus BHD [5 g/(kg·d)] group. Plasma lipids, endothelin-1 (ET-1), nitric oxide (NO) and factor procoagulant activity (F : C) were detected and the histological atherosclerotic changes in aortic, abdominal aortic and coronary artery were evaluated. **Results** Compared with the MA group, serum total cholesterol ( $12.70 \pm 6.17$  vs  $26.6 \pm 10.41$  mmol/L,  $P < 0.01$ ), triglycerides ( $1.05 \pm 0.25$  vs  $2.72 \pm 1.55$  mmol/L,  $P < 0.01$ ), F : C ( $135.36 \pm 34.54$  vs  $287.84 \pm 66.87$ ,  $P < 0.01$ ), and NO ( $30.23 \pm 12.91$  vs  $112.30 \pm 23.00$ ,  $P < 0.01$ ) were significantly lower in the MA plus BHD group, and this decoction inhibited the progression of aortic, abdominal aortic and coronary intimal plaques and reduced aortic intimal thickening. **Conclusions** These data suggested that BHD have antiatherogenic effects and its mechanism might associate with the decrease of plasma cholesterol, triglycerides, nitric oxide and factor procoagulant activity. (A kind of traditional Chinese decoction consisted of seven kinds of Chinese medicine: astragalus; angelica; ligusticum; paeonia; earthworm; swietenia and carthamus.)

补阳还五汤 (buyang huanwu decoction, BHD) 是收载于《医林改错》中的经典方剂, 具有补气活血、通经活络的功效, 临床上常用于防治心脑血管意外及其后遗症的治疗。近年来医学研究证明, 补阳还五汤具有扩张血管、改善微循环、降低血小板聚集率, 抗炎、抗氧化和保护血管内皮细胞之功能<sup>[1,2]</sup>, 但其具体机制尚不清楚, 尤其是对动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成过程有何影响, 目前很少见报道。本文对此进行了研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物制备

补阳还五汤各成分购自中南大学湘雅医院, 依原方组药, 其中黄芪 40 g, 川芎 15 g, 当归 15 g, 赤芍 15 g, 桃仁 12 g, 红花 12 g, 地龙 10 g。将上述各组药混合后水煎煮 3 次, 时间分别为 1.5 h、1 h 和 45 min。合并煎煮液后浓缩成含生药浓度相当于 2 500 g/L 备用。

### 1.2 动物分组与处理

健康日本雄性大耳白兔 36 只, 体重 1.5 kg, 3~4 月龄, 由本校动物学部提供。动物在适应性喂养 3 天后, 随机分为 3 组: 正常对照组 (Control 组) 喂普通饲料; ④As 组除普通饲料外, 每兔每日另加胆固醇 1.5 g、猪油 5 g 和鸡蛋 15 g; ④补阳还五汤组

[收稿日期] 2001-10-08 [修回日期] 2002-02-24

[基金项目] 国家自然科学基金 (C39600197) 和国家教育部优秀青年教师基金 (教人司 2001: 39 号) 资助。

[作者简介] 尚改萍, 女, 1966 年出生, 山西长治人, 硕士研究生, 讲师, 主要从事血液生理学研究。文志斌, 男, 1962 年出生, 湖南长沙人, 博士, 生理学副教授, 主要从事中草药对心脑血管疾病防治作用的研究, 为本文通讯作者。

(BHD 组) 所喂饲料同 As 组, 但同时给予补阳还五汤煎剂, 其中第 1~2 周通过灌胃给药, 以后拌入正常饲料中。每兔每天经上午、下午两次给药, 日总量相当于含生药 5 g/kg (相当于体重为 70 kg 的成人用量)。上述各组兔均限食量, 每兔每日 150 g, 分笼喂养, 自由饮水, 共喂养 9 周。所有动物在喂养 9 周后心脏取血。注入空气栓塞处死动物, 然后进行下列指标的检测。

### 1.3 病理形态学检查

#### 1.3.1 主动脉及腹主动脉粥样斑块面积的测量

动物处死后立即取主动脉及腹主动脉纵行剪开, 平铺在滤纸上, 以 10% 福尔马林液固定。经苏丹 Ⅳ 染色, 观察动脉粥样硬化斑块病变, 用透明方格纸 (1 mm × 1 mm) 测量每条主动脉及腹主动脉粥样硬化面积, 并计算病变面积占总面积的百分比; 自主动脉弓取材作石蜡切片, HE 染色光镜下观察主动脉及腹主动脉的形态, 用测微尺测量动脉粥样斑块的最大厚度。

1.3.2 冠状动脉堵塞情况 于心脏房室沟直下方每 0.3 cm 作一个横切面, 共切 3 块, 每块的厚度约 0.3 cm, 均作 HE 染色。光镜下观察冠状动脉病变阻塞血管分支的情况 (平滑肌 1~2 层为小支, 3~5 层为中支, 大于 5 层为大支)。在每一只家兔的肌切片中计数 50 个动脉, 计算动脉粥样硬化血管所占的百分率。

#### 1.4 血脂、内皮素和一氧化氮的测定

采用酶法测定血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 量。采用放射免疫测定法测定血浆中内皮素的含量。

采用 Griess 法<sup>[3]</sup> 测定一氧化氮 (nitric oxide, NO)。取血清 1.5 mL, 加入 30% 的 ZnSO<sub>4</sub> 溶液 50 μL, 振荡后离心 20 min (3 000 r/min), 用上清液测定 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量。取 100 μL 上清液或不同浓度的 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 标准液或空白液与等体积的 Griess 反应试剂均匀混合, 以试剂空白液作参比, 室温下反应 5 min, 540 nm 波长下测光密度 (OD) 值。以 OD 值为纵坐标, CNO<sub>2</sub><sup>-</sup> 为横坐标建立标准曲线, 从标准曲线中求出待测标本中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量。

#### 1.5 血浆凝血因子 促凝活性测定<sup>[4]</sup>

将 100 μL 稀释 20 倍的受检测血浆或 100 μL 不同稀释浓度的标准血浆与 100 μL 缺乏凝血因子的基质血浆和 100 μL 兔脑浸出液相加并混匀, 置于 37℃ 水浴中温育 30 s, 然后加入 0.025 mol/L 氯化钙溶液 100 μL, 37℃ 水浴中摇动, 记录其凝固时间。以不同稀释浓度标准血浆的凝固时间 (s) 为纵坐标, 以

标准血浆的凝血因子 因子活性 (%) 为横坐标 (以 10 倍稀释的标准血浆活性为 100%), 制作标准曲线。将受检血浆所测的凝固时间, 从标准曲线上得出相当于正常人凝血因子 促凝活性的百分比, 将该值 × 2, 即为受检血浆凝血因子活性的水平 (%)。

#### 1.4 统计学处理

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 INSTAT 统计软件, 组间比较用 *F* 检验。若  $F > F_{0.05}$ , 则两两比较用 *q* 检验。

## 2 结果

### 2.1 主动脉、腹主动脉及冠状动脉的病理形态

从表 1 (Table 1) 可见, 正常对照组动脉内膜光滑, 未见粥样斑块及脂质点, 镜下内膜完整, 内皮下无脂质沉积。动脉粥样硬化组和补阳还五汤组均有不同程度的动脉粥样硬化形成, 但补阳还五汤组病变程度明显轻于动脉粥样硬化组, 在斑块面积与整条动脉面积比以及斑块厚度方面, 两组间差异有显著性 ( $P < 0.01$ ); 镜下可见斑块内主要为大量的泡沫细胞堆积, 严重者泡沫细胞崩解, 可见胆固醇结晶析出, 并有平滑肌细胞的增殖。除正常对照组外, 动脉粥样硬化组和补阳还五汤组均可见冠状动脉脂质沉积和斑块形成, 血管病变多见于中小枝, 呈现不同程度的内膜增厚, 管腔狭窄, 但补阳还五汤组的血管狭窄程度和病变血管数明显较动脉粥样硬化组轻且少 ( $P < 0.01$ )。

表 1. 三组患者动脉病理检查结果。

Table 1. The pathological results of aorta and coronary artery in different groups ( $\bar{x} \pm s$ ).

Groups	<i>n</i>	Area (%)	Thickness (mm)	CA (%)
Control	12	0	0	0
As	12	42.51 ± 15.98	1.21 ± 0.42	21.73 ± 6.18
BHD	12	17.61 ± 6.19 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.35 <sup>a</sup>	12.04 ± 5.46 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with As group. Area: Percentage of the area atherosclerotic plaque in total area. CA: Percentage of coronary artery atherosclerotic plaque.

### 2.2 血清中脂质的变化

动脉粥样硬化组和 BHD 组血清中总胆固醇和甘油三酯含量均升高 ( $P < 0.01$ ), 但 BHD 组血清中总胆固醇和甘油三酯值明显较动脉粥样硬化组降低 ( $P < 0.01$ ), 说明补阳还五汤具有降低总胆固醇和甘油三酯的作用 (表 2, Table 2)。

表 2. 各组血清甘油三酯和总胆固醇的变化( $\bar{x} \pm s$ ).

Table 2. The changes of TC and TG in different groups.

Groups	n	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)
Control	12	0.89 $\pm$ 0.25	0.69 $\pm$ 0.18
As	12	26.60 $\pm$ 10.41 <sup>a</sup>	2.72 $\pm$ 1.55 <sup>a</sup>
BHD	12	12.70 $\pm$ 6.17 <sup>b</sup>	1.05 $\pm$ 0.26 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with control group; b:  $P < 0.01$ , compared with As group.

### 2.3 血浆一氧化氮、内皮素及凝血因子 促凝活性的水平

动脉粥样硬化组和 BHD 组凝血因子 :C 均升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ), 但 BHD 组凝血因子 :C 值较 As 组明显降低 ( $P < 0.01$ )。3 组间血浆内皮素含量无明显改变 ( $P > 0.05$ )。As 组血浆中 NO 水平明显高于正常对照组 ( $P < 0.01$ ); 而 BHD 组 NO 水平与对照组相比没有明显改变 (表 3, Table 3)。

表 3. 血浆中一氧化氮、内皮素和凝血因子 :C 促凝活性的变化。

Table 3. The effects of BHD on NO, ET-1 and F : C in plasma( $\bar{x} \pm s$ ).

Groups	n	NO( $\mu$ mol/L)	ET-1 (ng/L)	F : C (%)
Control	10	32.28 $\pm$ 11.60	148.19 $\pm$ 36.12	84.73 $\pm$ 12.30
As	10	112.30 $\pm$ 23.00 <sup>b</sup>	161.30 $\pm$ 25.13	287.84 $\pm$ 66.87 <sup>b</sup>
BHD	10	30.23 $\pm$ 12.91	149.25 $\pm$ 30.58	135.36 $\pm$ 34.54 <sup>ac</sup>

a:  $P < 0.01$ , b:  $P < 0.05$ , compared with control group, c:  $P < 0.01$ , compared with As group.

## 3 讨论

本文用高脂高胆固醇饲养成功建立了动脉粥样硬化模型,其主要表现为血脂升高,大动脉及冠状动脉内皮下脂质浸润,大面积粥样斑块形成等病理改变。加饲补阳还五汤的动物受累血管病变程度轻、数量少,同时血清中 TC 和 TG 水平下降,说明补阳还五汤具有抗兔 As 形成的作用。

近年研究表明,血管内皮细胞分泌 NO,通过激活鸟苷酸环化酶,使细胞内 cGMP 水平升高,从而松弛血管平滑肌<sup>[5]</sup>。NO 还可抑制血小板的粘附、聚集,抑制血管平滑肌增殖,拮抗 ET-1 的作用,清除 O<sup>2-</sup>。内皮细胞受损,NO 分泌减少,ET-1 分泌增加,血管紧张性及外周阻力增加;ET-1 还促进平滑肌细胞的有丝分裂,加速血管平滑肌的增殖,加重管壁的缺氧以及降低心脏的泵血功能等<sup>[5,6]</sup>。本结果发现 As 组 NO 分泌增加,这与 Harrison 等<sup>[7]</sup>报道一致。他

们认为高胆固醇饲养兔,虽然 NO 总释放量增加,但其生物活性明显降低,因为高胆固醇血症时, O<sup>2-</sup> 生成增多,NO 与超氧阴离子迅速作用,使之降解。而加饲补阳还五汤动物血浆中 NO 水平并无明显改变,可能与补阳还五汤降低血脂、抑制氧自由基引起的脂质过氧化反应有关。此外,三组 ET-1 水平无明显差异,这与 Grantham 等<sup>[8]</sup>实验结果相似,Grantham 发现 As 兔血浆 ET-1 并不升高,只有病变局部 ET-1 表达增加,这与人类糖尿病引起的 As 情况不同<sup>[9]</sup>,后者血浆中 ET-1 水平明显升高,这种差异需要进一步探讨。

凝血因子 促凝活性反映 F 的生物活性大小,与 F 总量之间存在明显的相关性。一些前瞻性研究及临床观察认为胆固醇和 F : C 是缺血性心脑血管疾病的两个独立危险因素,且 F : C 比胆固醇具有更大的危险性<sup>[10]</sup>。本室结果发现,As 组 F : C 明显升高,而补阳还五汤组 F : C 明显降低,说明补阳还五汤具有降低 F : C 的作用,这可能是其对冠心病、脑中风等心脑血管疾病具有较好治疗作用的原因之一。至于补阳还五汤为何能抑制高脂血症造成的 F : C 升高,其机理尚未弄清楚。Green 等<sup>[11]</sup>报道 TG 能使血浆中 F : C 增加,而补阳还五汤具有降低 TG 作用,这可能是其降低高脂模型动物血浆中 F : C 的重要原因。

### [参考文献]

- [1] 梁翠微,郑有顺. 补阳还五汤药理研究与临床应用新进展. 中成药, 1998, 20 (1): 41-42
- [2] 贺石林,彭延占,李安国,等. 补阳还五汤对血液凝固的实验研究. 湖南中医学院学报, 1989, 9 (4): 212
- [3] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem, 1982, 126 (1): 131-138
- [4] 王振义,李家增,阮长耿,等主编. 血栓与止血-基础理论与临床,第一版. 上海:上海科学技术出版社,1996: 641
- [5] Napol C, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis. Nitric Oxide, 2001, 5 (2): 88-97
- [6] Barton M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis: endothelin receptor antagonists as novel therapeutics. Curr Hypertens Rep, 2000, 2 (1): 84-91
- [7] Harrison DG, Ohara Y. Physiologic consequences increased vascular oxidant stresses in hypercholesterolemia and atherosclerosis. Implication for impaired vasomotion. Am J Cardiol, 1995, 75: 75B-81B
- [8] Grantham JA, Schirger JA, Williamson EE, et al. Enhanced endothelin converting enzyme immunoreactivity in early atherosclerosis. J Cardiovasc Pharmacol, 1998, 31 (Suppl): 522-526
- [9] Gurener N, Artemir K, Aksoyek S, et al. Plasma endothelin-1 levels in non-insulin dependent diabetes mellitus patients with macrovascular diseases. Coron Artery Dis, 1997, 8: 253-258
- [10] Scarabin PY, Aillaud MF, Amouyel P, et al. Associations of fibrinogen, factor and PAI-1 with baseline findings among 10,500 male participants in a prospective study of myocardial infarction: the PRIME Study. Prospective Epidemiological Study of Myocardial Infarction. Thromb Haemost, 1998, 80: 749-756
- [11] Green D, Chamberlain MR, Ruth KJ, et al. F, cholesterol and triglycerides. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17: 51

(此文编辑 朱雯霞)