

[文章编号] 1007-3949(2003)11-05-0419-04

•实验研究•

血脂康对血脂和血管内皮细胞活性物质的影响

吴伟, 郑晓伟, 陈燕, 邢福琴, 曾定尹

(中国医科大学附属第一医院急诊科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 药理学; 血脂康对血脂和血管内皮细胞活性物质的调节作用; 放射免疫测定; 动脉粥样硬化; 一氧化氮; 血栓素; 家兔

[摘要] 探讨血脂康对高胆固醇饮食家兔血脂和血管内皮细胞活性物质的影响。健康纯种新西兰白兔 30 只, 随机分为对照组(饲以普通饲料)、高脂组(饲以普通饲料+ 1.5% 胆固醇)、治疗组[饲以普通饲料+ 1.5% 胆固醇+ 血脂康 0.8 g/(kg·d)]。在实验不同阶段, 观察各组家兔血清脂质、一氧化氮及血浆内皮素、前列环素、血栓素含量及血管内皮细胞病理形态学改变。实验前各组血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、血浆内皮素、血清一氧化氮、血浆血栓素及 G 酮前列腺素等无明显差异。实验 12 周, 高脂组、血脂康治疗组血清总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、血浆内皮素、血清一氧化氮、血浆血栓素及 G 酮前列腺素比值明显高于对照组, 但治疗组上述指标明显低于高脂组(P 值均 < 0.05); 高脂组和治疗组血清一氧化氮低于对照组($P < 0.05$), 但治疗组高于高脂组($P < 0.05$)。病理结果显示: 血脂康治疗组主动脉、冠状动脉粥样硬化病变及血管内皮细胞损伤明显轻于高脂组。提示血脂康具有明显的调整脂质代谢和影响血管内皮细胞活性物质生成的作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effects of Xuezhi Kang on Cholesterol and Activity Substances in Vascular Endothelial Cells

WU Wei, ZHENG Xiao-Wei, CHEN Yan, XING Fu-Qin, and ZENG Ding-Yin

(Department of Emergency Medicine, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Nitric Oxide; Thromboxane; Rabbits; Xuezhi Kang; Radiative Immunity Assay

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of Xuezhi Kang on cholesterol and functions of endothelial cells in cholesterol-fed rabbits. **Methods** The effects of Xuezhi Kang [0.8 g/(kg·d)] on the functions of endothelial cell during the progression of atherosclerosis were investigated in rabbits fed with 1.5% cholesterol diet in this study. 30 New Zealand white rabbits were divided into three groups (control group, hypercholesterol group and Xuezhi Kang group) during the 12 weeks experiment. Serum lipids, nitrous oxide (NO) and plasma endothelin-1 (ET-1), thromboxane (TX), G ketoprostanoid $F_{1\alpha}$ (G ketoprostanoid $PGF_{1\alpha}$) concentrations and histopathological changes of endothelial cells were followed. **Results** Serum total cholesterol, low density lipoprotein cholesterol, triglyceride, plasma ET-1 concentrations and the ratio of TX/G ketoprostanoid $PGF_{1\alpha}$ in plasma decreased and serum NO level increased in Xuezhi Kang group as compared with those of hypercholesterol group ($P < 0.05$). The area of lipid deposition on the intimal surface of the aorta and coronary arteries was reduced and the ultrastructural injuries of endothelial cells were milder in Xuezhi Kang group. **Conclusion** Xuezhi Kang had antiatherogenic properties and the protection to the functions of vascular endothelial cells which might be involved in the mechanisms of Xuezhi Kang against atherosclerosis.

血管内皮细胞损伤引起动脉粥样硬化病变发展的假说是由 Ross^[1] 最先提出的。内皮细胞位于血管壁平滑肌细胞和循环血小板、单核细胞之间, 在机械和体液信号作用下, 内皮细胞灭活血管活性物质如

血清素、缓激肽, 释放血管收缩物质(内皮素 1、血管紧张素 II) 及血管舒张物质(前列环素、一氧化氮), 从而调节血管张力, 阻止血小板和单核细胞的黏附、聚集以及维持凝血和抗凝血机制间的平衡。因此, 保护和恢复血管内皮细胞功能在预防和治疗动脉粥样硬化中有重要意义。

血脂康(Xuezhi Kang)是由中药红曲精炼而成的高效调脂药物, 主要成分为 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂, 同时含有多种必需氨基酸和不饱和脂肪酸。本实验用食料添加 1.5% 的胆固醇喂饲家兔动脉粥样硬化模型, 观察血脂康对高胆固醇饮食家兔血脂和血管内皮细胞分泌生物活性物质的作用。

[收稿日期] 2002-11-25 [修回日期] 2003-04-28

[作者简介] 吴伟, 男, 1960 年出生, 辽宁省沈阳市人, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 急诊科副主任, 主要从事急性冠状动脉综合征特别是急性心肌梗死的临床研究, 发表论文 50 余篇, 出版专著 2 部, 担任中华临床医学研究杂志、中国全科医学杂志等 6 种杂志的编委或特约编委, 电话: 024-86842840, E-mail: sakura007wu@yahoo.com.cn。郑晓伟, 女, 1972 年出生, 辽宁省沈阳市人, 讲师, 主治医师, 主要从事急性冠状动脉综合征的临床研究, 发表论文 10 余篇。曾定尹, 男, 1940 年出生, 湖北省武汉市人, 教授, 博士研究生导师, 循环内科主任, 发表论文 60 余篇。

1 材料与方 法

1.1 家兔动脉粥样硬化模型的建立

健康纯种新西兰白兔 30 只,雌雄各半,体重 2.57 ± 0.17 kg,4 个月龄。实验前适应性饲养 2 周,随机分为对照组(喂饲普通颗粒饲料)、高脂组(喂饲普通颗粒饲料+ 1.5% 胆固醇)、治疗组[喂饲普通颗粒饲料+ 1.5% 胆固醇+ 血脂康 0.8 g/(kg·d)]。血脂康为北大维信公司生产。动物单笼饲养 12 周。

1.2 各种物质的测定

血浆内皮素、前列环素、血栓素的测定采用北京东亚免疫技术研究所生产的试剂盒,用自动计数仪进行非平衡法放射免疫测定,分别检测血浆中内皮素、 $6\text{-}\alpha$ -前列腺素 $F_{1\alpha}$ 及血栓素含量。血清一氧化氮测定参照文献[2,3]的方法,取血清 0.5 mL,加 35% 磺基水杨酸 0.1 mL 沉淀蛋白, -4°C 离心 15 min,离心力 1000 g,然后取上清 0.1 mL,加 Griess 试剂和 4 mol/L HCl 各 0.1 mL,室温反应 10 min,用酶联免疫仪在 570 nm 测吸光度,以亚硝酸盐作标准曲线,结果以一氧化氮转变为亚硝酸盐量(mg/L)表示。血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)等采用酶法测定,试剂盒为北京中生生物工程高技术公司生产,用日立 7060 型全自动生物化学分析仪进行检测。血清低密度脂蛋白

胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)由 Friedwald 公式计算: $\text{LDLC} = (\text{TC} - \text{HDLC}) - \text{TG} / 2.2$ 。

1.3 取材、病理标本制作及观察

试验开始前及以后的 4、8、12 周清晨空腹从耳中央动脉采血 1 mL,测定血清 TC、TG、HDLC 及血浆内皮素、前列环素、血栓素含量。第 12 周末,放血法处死全部动物,将主动脉从主动脉根部至髂总动脉分叉处取出,剥离外膜结缔组织,从腹侧面纵行剖开,生理盐水冲洗干净。取主动脉弓及心肌标本,分别行 10% 甲醛及 2.5% 戊二醛固定,常规制作光镜及透射电镜标本,分别观察各组主动脉弓、冠状动脉血管壁及血管内皮细胞组织形态学改变。

1.4 统计学处理

全部实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两均数间比较用 t 检验,多组间比较用单因素方差分析,不同指标间行线性相关分析。

2 结果

2.1 血脂康对血脂的影响

实验前各组间血脂无明显差异;实验后 4、8、12 周,高脂组、治疗组血清 TC、TG、LDLC 明显高于对照组($P < 0.05$),而治疗组明显低于高脂组($P < 0.05$);高脂组 HDLC 与对照组和治疗组相比差异无显著性($P > 0.05$),但高脂组出现明显下降趋势。见表 1(Table 1)。

表 1. 3 组血清总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇变化

Table 1. Serum TC, TG, HDLC and LDLC variety in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

指 标	分 组	<i>n</i>	实验前	实验 4 周	实验 8 周	实验 12 周
TC (mmol/L)	对照组	10	1.48 ± 0.09	1.51 ± 0.09	1.51 ± 0.11	1.53 ± 0.12
	高脂组	10	1.49 ± 0.13	9.52 ± 0.51^a	17.88 ± 2.08^a	22.51 ± 2.32^a
	治疗组	10	1.48 ± 0.11	4.32 ± 0.64^{ab}	7.79 ± 0.99^{ab}	12.11 ± 1.21^{ab}
TG (mmol/L)	对照组	10	1.06 ± 0.10	1.08 ± 0.11	1.04 ± 0.10	1.07 ± 0.09
	高脂组	10	1.09 ± 0.11	1.36 ± 0.29^a	1.84 ± 0.20^a	2.15 ± 0.29^a
	治疗组	10	1.08 ± 0.11	1.22 ± 0.12^{ab}	1.40 ± 0.11^{ab}	1.68 ± 0.14^{ab}
HDLC (mmol/L)	对照组	10	0.35 ± 0.06	0.39 ± 0.06	0.37 ± 0.10	0.40 ± 0.09
	高脂组	10	0.36 ± 0.05	0.33 ± 0.09	0.31 ± 0.11	0.32 ± 0.12
	治疗组	10	0.36 ± 0.11	0.39 ± 0.10	0.39 ± 0.13	0.40 ± 0.11
LDLC (mmol/L)	对照组	10	0.64 ± 0.12	0.63 ± 0.09	0.68 ± 0.10	0.64 ± 0.13
	高脂组	10	0.63 ± 0.08	8.57 ± 0.38^a	16.73 ± 1.99^a	21.21 ± 2.12^a
	治疗组	10	0.63 ± 0.09	3.42 ± 0.48^{ab}	6.77 ± 0.94^{ab}	10.95 ± 1.06^{ab}

a: $P < 0.05$, 与对照组相比; b: $P < 0.05$, 与高脂组相比。TC: 总胆固醇(total cholesterol); TG: 甘油三酯(triglyceride); HDLC: 高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol); LDLC: 低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol)。

2.2 血脂康对血浆内皮素及血清一氧化氮的影响

实验前各组间血浆内皮素及血清一氧化氮无明显差异;实验后 4、8、12 周高脂组、治疗组血浆内皮

素明显高于对照组,血清一氧化氮低于对照组(P 值均 < 0.05);治疗组内皮素低于高脂组,一氧化氮高于高脂组(P 值均 < 0.05)。见表 2(Table 2)。

表 2. 3 组血浆内皮素 1、血清一氧化氮变化

Table 2. Blood plasma endothelin-1 and serum nitric oxide variety in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

指 标	分 组	<i>n</i>	实验前	实验 4 周	实验 8 周	实验 12 周
内皮素 (ng/L)	对照组	10	186 ± 23	189 ± 25	189 ± 26	188 ± 20
	高脂组	10	187 ± 25	272 ± 33 ^a	323 ± 35 ^a	369 ± 38 ^a
	治疗组	10	186 ± 24	202 ± 22 ^{ab}	226 ± 30 ^{ab}	259 ± 33 ^{ab}
一氧化氮 (mg/L)	对照组	10	17 ± 3	17 ± 3	17 ± 3	17 ± 3
	高脂组	10	17 ± 3	14 ± 3 ^a	10 ± 2 ^a	8 ± 3 ^a
	治疗组	10	17 ± 3	15 ± 3 ^{ab}	15 ± 3 ^{ab}	14 ± 2 ^{ab}

a: $P < 0.05$, 与对照组相比; b: $P < 0.05$, 与高脂组相比。

2.3 血脂康对血浆血栓素、 α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 、血栓素/ α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 的影响

实验前,各组间血浆血栓素、 α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 、血栓素/ α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 无明显差异。实验后 4、8、12 周,高脂组血浆血栓素含量、血栓素/ α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 比值明显高于对照组($P < 0.05$), α -酮-前列

腺素 $F_{1\alpha}$ 比对照组低,但无统计学意义;治疗组血浆 α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 无明显改变,血栓素含量较对照组明显增加,但显著低于高脂组($P < 0.05$);从 8 周起治疗组血栓素/ α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 较对照组开始上升,但明显低于高脂组($P < 0.05$) (表 3, Table 3)。

表 3. 3 组血浆 α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 、血栓素 B_2 、血栓素 B_2 / α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 变化

Table 3. Blood plasma α -ketop-PGF_{1 α} , TXB₂ variety in the three groups ($\bar{x} \pm s$)

指 标	分 组	<i>n</i>	实验前	实验 4 周	实验 8 周	实验 12 周
α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (ng/L)	对照组	10	109 ± 12	108 ± 10	110 ± 14	110 ± 18
	高脂组	10	109 ± 10	104 ± 10	100 ± 9	97 ± 10
	治疗组	10	109 ± 12	110 ± 11	107 ± 9	105 ± 11
血栓素 B_2 (ng/L)	对照组	10	85 ± 7	85 ± 10	85 ± 10	85 ± 8
	高脂组	10	85 ± 8	122 ± 10 ^a	225 ± 24 ^a	339 ± 28 ^a
	治疗组	10	85 ± 9	99 ± 11 ^{ab}	141 ± 13 ^{ab}	193 ± 18 ^{ab}
血栓素 B_2 / α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$	对照组	10	0.79 ± 0.14	0.80 ± 0.16	0.79 ± 0.18	0.80 ± 0.21
	高脂组	10	0.79 ± 0.14	1.19 ± 0.21 ^a	2.36 ± 0.46 ^a	3.44 ± 0.49 ^a
	治疗组	10	0.79 ± 0.15	0.91 ± 0.18 ^b	1.33 ± 0.22 ^{ab}	1.86 ± 0.33 ^{ab}

a: $P < 0.05$, 与对照组相比; b: $P < 0.05$, 与高脂组相比。

2.4 血脂质与内皮素、血栓素/ α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 的相关性分析

血浆 TC、LDLC、TG 与内皮素、血栓素/ α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 呈正相关($r = 0.762 \sim 0.957$, $P < 0.001$);内皮素与血栓素/ α -酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ 呈正相关($r = 0.921$, $P < 0.001$)。

2.5 病理形态学观察

对照组主动脉内膜平坦,中膜平滑肌细胞排列规则整齐,与弹力板近似平行相间排列。实验 12 周

末高脂组主动脉内膜下有大量泡沫细胞,约 9~14 层,一些泡沫细胞裂解,脂质类物质游离于细胞外,中膜平滑肌细胞排列不规则,内弹力板分离断裂,可见中膜平滑肌细胞向内膜迁移趋势,冠状动脉前降支内膜增厚,部分心肌小血管几乎完全闭塞。治疗组主动脉病变明显轻于高脂组,泡沫细胞有 4~5 层,冠状动脉接近正常,偶于分叉处见少量泡沫细胞。电镜下可见对照组内皮细胞扁平完整,内皮细胞间连接紧密,内皮下间隙狭小,胞质内呈现含量不

等的内质网和线粒体等细胞器;实验 12 周末高脂组内皮细胞变性肿胀,内皮细胞间连接明显扩大,胞浆内含有为数不等的脂滴,胞体突入管腔或脱落;治疗组内皮细胞超微结构基本正常。

3 讨论

动脉粥样硬化的形成机制是由于众多冠心病危险因素损伤内皮而发生的一系列反应^[1],其中内皮细胞功能障碍,产生和释放的一氧化氮、内皮素、前列环素、血栓素 A 等生物活性物质平衡失调,被认为是动脉粥样硬化等疾病的影响因素^[4]。血脂康作为国内一种富含羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂成分的调脂药物,经动物试验和临床治疗前后自身对照观察,证实它具有明显的降低血清胆固醇作用^[5]。本实验证实,家兔进食高胆固醇饮食 4 周时,即出现血浆内皮素、血栓素、血栓素/6-酮-前列腺素 F_{1α}明显上升及一氧化氮明显下降,随时间推移逐渐加重;血浆 6-酮-前列腺素 F_{1α}的改变与对照组相比虽无统计学差异,但随 TC 升高有下降趋势;12 周末高脂组主动脉弓及冠状动脉形成明显的动脉粥样硬化病变,电镜下血管内皮细胞变性肿胀,超微结构改变明显。可见在家兔食饵性动脉粥样硬化形成的早期即出现了血管内皮细胞功能的改变,而且随时间推移而加重。

内皮素在正常情况下由血管内皮细胞产生和分泌,是迄今发现的最强烈的缩血管活性多肽,它通过激活磷脂酶 C 起到有丝分裂原的作用,刺激血管平滑肌细胞内 c-fos、c-myc 基因表达,增加血管平滑肌细胞 DNA 合成,促进血管平滑肌细胞增殖^[6,7],因此在动脉粥样硬化形成过程中起重要作用。一氧化氮在生理状态下由血管内皮细胞产生,通过激活鸟苷酸环化酶,使细胞内环磷酸鸟苷增高,产生一系列生物效应:如松弛血管平滑肌,维持血管舒张状态;抑制血小板的黏附聚集,影响白细胞黏附分子 CD₁₁、CD₁₈的活性或抑制其表达;抑制平滑肌细胞分裂增殖,减少胶原纤维、弹力纤维的产生;携带额外电子,清除自由基,抑制脂质过氧化反应^[8]。因此,保护内皮细胞功能正常,维持内皮细胞产生的内皮素、一氧化氮在血清中的平衡状态有重要意义。本研究表明,血脂康治疗组血浆内皮素、一氧化氮、血栓素、6-

酮-前列腺素 F_{1α}及血栓素/6-酮-前列腺素 F_{1α}虽有改变,但明显轻于高脂组($P < 0.05$),动脉粥样硬化斑块也明显少于高脂组,内皮细胞超微结构改变也比高脂组轻。证明血脂康能延缓高胆固醇饮食引起的血浆内皮素增加及一氧化氮下降,维持血栓素/6-酮-前列腺素 F_{1α}平衡,具有保护血管内皮细胞功能及抑制动脉粥样硬化形成的作用。

很多实验证实,血栓素 A₂/前列腺素 I₂失衡对动脉粥样硬化发病有一定影响^[9,10]。本实验中血栓素 A₂/前列腺素 I₂比例失调主要由血栓素 A₂增加引起。血脂康能纠正高胆固醇饮食引起的血栓素/6-酮-前列腺素 F_{1α}失衡,血浆 TC、LDLC、内皮素与血栓素/6-酮-前列腺素 F_{1α}呈正相关。血脂康通过调整脂质代谢,抑制内皮素分泌,从而降低血栓素/6-酮-前列腺素 F_{1α}比值。另外抑制脂质过氧化的大量产生,使血管壁前列腺素 I₂生成增加也可能是其主要原因。血管内皮功能的改变在动脉粥样硬化形成的早期,在斑块形成之前即可发生。内皮损伤后引起的一系列炎性反应促进了动脉粥样硬化的进展^[1,3]。本实验证实,血脂康具有调节血脂和保护高胆固醇饮食家兔血管内皮细胞功能的作用,这是其防治动脉粥样硬化发生、发展的重要机制。

[参考文献]

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801-809
- [2] Termin A, Hoffmann M, Bing RJ. A simplified method for the determination of nitric oxide in biological solutions. *Life Sci*, 1992, **51** (20): 1 621-629
- [3] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, **126** (1): 131-138
- [4] Lüscher TF, Noll G. The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis*, 1995, **118** (Suppl): S81-90
- [5] 沈志卫, 于普林, 孙美珍. 血脂康治疗原发性高脂血症的前瞻性研究. *中华医学杂志*, 1996, **76** (2): 156-157
- [6] Hirata Y, Takagi Y, Fukuda Y, Movumo F. Endothelin is a potent mitogen for rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1989, **78**: 225-228
- [7] Bobik A, Grooms A, Miller JA, Mitchell A, Grinpukel A. Growth factor activity of endothelin on vascular smooth muscle. *Am J Physiol*, 1990, **258** (3 Pt 1): C408-C415
- [8] 李中言, 赵连友. 一氧化氮与心血管疾病. *中华心血管病杂志*, 1996, **24** (1): 73-76
- [9] 陈晖, 沈潞华, 谢苗荣, 李东宝. 氟伐他汀对内膜损伤后动脉粥样硬化家兔内皮细胞功能的改善作用. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 39-42
- [10] 程训民, 余宗梅, 骆合德, 邱一华, 陈敏雄. 血脂康对高血脂患者内皮功能的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (3): 235-237

(此文编辑 曾学清)