

四逆汤对高胆固醇喂饲所致动脉粥样硬化形成和氧化损伤的影响

吴伟康, 黑子清¹, 孙惠兰, 梅开勇², 罗汉川

(中山大学中山医学院中西医结合研究所, 广东省广州市 510089;

1. 中山大学附属第一医院麻醉科; 2. 中山大学中山医学院病理学教研室)

[关键词] 药理学; 四逆汤的抗动脉粥样硬化作用; 病理学检查; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 主动脉; 兔

[摘要] 为了观察四逆汤对高胆固醇喂饲所致家兔实验性动脉粥样硬化形成和氧化损伤的影响, 采用高胆固醇喂饲模型; 将 24 只新西兰家兔随机分为 3 组: 正常组、模型组、四逆汤组, 分别给予普通饲料(正常对照组)和高胆固醇饮食(其它 2 组)喂养, 四逆汤组另加用四逆汤方药; 实验结束后, 观察血管病理变化、血和血管超氧化物歧化酶活性、血浆和血管丙二醛含量、超氧化物歧化酶蛋白和基因表达。结果发现, 与模型组相比, 四逆汤组主动脉脂质斑块面积、内膜斑块面积和厚度明显降低; 血和血管超氧化物歧化酶活性明显增加; 血浆和血管丙二醛的含量明显增加; 血管超氧化物歧化酶蛋白和基因表达明显增强。研究结果提示, 四逆汤具有较好的抗动脉粥样硬化作用, 抗氧化损伤可能是四逆汤产生抗动脉粥样硬化作用的重要机制之一。

[中图分类号] R961

[文献标识码] A

The Effects of Sini Decoction on Atherosclerosis and Oxidative Injury in Rabbits Fed with Cholesterol Rich Diet

WU Wei-Kang, HEI Zi-Qing¹, SUN Hui-Lan, MEI Kai-Yong², and LUO Han-Chuan

(Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Sun Yat-Sen College of Medical Sciences, Zhong Shan University, Guangzhou, Guangdong 510080, China; 1. The First Affiliated Hospital of Zhong Shan University; 2. The Department of Pathology, Sun Yat-Sen College of Medical Sciences)

[KEY WORDS] Superoxide Dismutase; Malondialdehyde; Aorta; Rabbit; Atherosclerosis; Sini Decoction

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of Sini decoction on atherosclerosis and oxidative injury in rabbits fed with cholesterol rich diet. **Methods** 24 rabbits were randomly divided into three groups. Normal group was fed with normal diet; Model group was fed 1% cholesterol and 5% fat diet; Sini decoction group was fed 1% cholesterol and 5% fat diet plus Sini decoction [2.1 g/(kg·d)]. At the end of study, the plaque area were measured, superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content of blood and aorta were detected. SOD protein and gene expression were observed with immunohistochemistry and hybridization in situ method. **Results** Compared with model group, Sini decoction could diminish lipid plaque area, intimal plaque area and intimal thickness, reduce the levels of aorta and serum MDA, increase aorta and serum SOD activity, increase the expressions of SOD protein and SOD gene in aorta. **Conclusions** The experimental results suggested that Sini decoction had antiatherogenic effects. The possible mechanism might be that Sini decoction could reduce oxidative injury in rabbits.

四逆汤是汉代医圣张仲景在《伤寒杂病论》中用于治疗少阴虚寒证的主方, 由附子、干姜、甘草组成。近年来我们的研究表明, 传统复方中药四逆汤

具有扩张冠状动脉, 对心肌缺血和缺血再灌注具有良好的抗氧化损伤作用^[1,2]。血管内皮氧化损伤在动脉粥样硬化的发病机制已得到公认^[3]。以前我们初步研究了四逆汤抗实验性动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的作用^[4]。在此基础上, 我们复制家兔 As 模型, 通过四逆汤用药, 继续观察四逆汤抗 As 作用, 并从多层次多角度验证该方是否能够通过抗氧化损伤而产生抗 As 作用。

1 材料与方法

1.1 药物制备

[收稿日期] 2002-11-04 [修回日期] 2003-06-10

[基金项目] 国家自然科学基金(30070930)资助

[作者简介] 吴伟康, 男, 1947 年出生, 汉族, 浙江省宁波市人, 1983 年中山医学院硕士研究生毕业, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管病理生理研究; 电话: 020-87331624, E-mail: WeiWuk@yahoo.com。黑子清, 男, 1967 年出生, 湖南省常德市人, 汉族, 副主任医师, 博士研究生毕业, 主要从事围术期心血管病理生理研究; 电话: 020-87334493, E-mail: heiziqing@sina.com。孙惠兰, 女, 1972 年出生, 山西省太原市人, 博士, 讲师, 主要从事中西医结合治疗动脉粥样硬化的研究。

四逆汤(Sini decoction)由附子[radix aconiti preparata(拉丁文,下同)]、干姜(rhizome)、甘草(radix glycyrrhizae)组成,由广东一方制药厂提供颗粒剂,按剂量比5:3:2配制。

1.2 动物分组及处理

健康新西兰大耳白兔24只,体重1.5~2.0 kg,雌雄不拘,5~6月龄,由中山大学医学院实验动物中心提供。将实验兔随机分为3组:正常组、模型组、四逆汤组。正常组喂饲基础饲料;模型组给予1%胆固醇加5%猪油饲料喂饲;四逆汤组,每兔每天每公斤体重给予含2.1 g生药(按人与动物体表面积比计算,为临床剂量的5倍,相当于药理中剂量)的四逆汤颗粒剂,混合于高脂胆固醇饲料中喂饲。后二组均每日先将造模药物或造模药物与四逆汤颗粒剂先拌于约50 g基础饲料中喂饲,待食完后再补足基础饲料。各动物给食一般每日限制在135~150 g。分笼饲养,自由饮水。造模及预防性用药10周。实验满10周后,各组动物自耳静脉取血,依据所测指标作不同的处理,分离血浆与血清。用气栓法处死动物,然后进行下列指标的检测。

1.3 主动脉斑块面积计算

从主动脉弓起始部至腹主动脉髂前分叉处取下主动脉,清除外膜脂肪组织。沿主动脉背部正中线剪开,用生理盐水清洗。将主动脉平铺于黑色布板上,摄像,用JVC彩色图像摄录输入仪和德国Kontron Ibas 2.5全自动图像分析仪,根据数字灰度图像,测定主动脉脂质斑块面积百分比。

1.4 主动脉病理学检查

主动脉弓起始部5 mm处取材0.5 cm左右,用含0.1%二乙基焦磷酸脂的4%多聚甲醛固定标本,石蜡包埋并切片。石蜡切片经HE染色,用德国ZEISS Axiotron研究显微镜,40倍下观察病理切片形态。取斑块最厚处,用JVC彩色图像摄录,将信号输入德国Kontron Ibas 2.5全自动图像分析仪,计算主动脉血管内膜和中膜斑块面积、内膜斑块面积与中膜斑块面积比、内膜的厚度。

1.5 血超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量测定

超氧化物歧化酶活性测定采用邻苯三酚微量快

速法,结果用ku/L表示;血浆丙二醛含量测定采用改良的八木国夫法,结果用mmol/L表示。

1.6 血管超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量测定

血管置于陶瓷器皿,于液氮下压成粉末状,取100 mg血管组织,制备成10%组织匀浆液。血管超氧化物歧化酶活性测定采用邻苯三酚微量法,结果用u/100 mg组织表示;血管丙二醛含量测定采用改良的八木国夫法,结果用nmol/100 mg组织表示。

1.7 血管超氧化物歧化酶蛋白和基因测定

取石蜡切片,血管超氧化物歧化酶蛋白用免疫组织化学法检测,超氧化物歧化酶基因表达用原位杂交法检测,均由武汉博士德公司提供试剂盒。

随机选取10个视野,在显微镜下(每高倍视野×400)根据阳性细胞数量多少及阳性细胞着色深度判定:阴性(-):背景颜色,无阳性细胞;弱阳性(+):<25%阳性细胞数,阳性细胞轻度着色;中等阳性(++):25%~75%阳性细胞数,阳性细胞中度着色;强阳性(+++):>75%阳性细胞数,阳性细胞着色很强。

1.8 统计学方法

应用SPSS 11.0软件进行统计分析。具体方法为:两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。计数资料应用多个独立样本比较的秩和检验,统计量用 χ^2 表示。

2 结果

2.1 主动脉病理改变

主动脉斑块面积百分比,四逆汤组明显小于模型组($P < 0.05$)(表1, Table 1)。模型组8只家兔中有3只病变严重,广泛累及主动脉各段内膜;四逆汤组有6只病变程度较轻,2只病变中等;正常组主动脉内膜光滑,未见病理改变。

主动脉光学显微镜观察:主动脉内膜斑块厚度,四逆汤组明显小于模型组($P < 0.05$);主动脉内膜斑块面积/中膜斑块面积比值,四逆汤组明显低于模型组($P < 0.01$)(表1, Table 1)。

表1. 模型组和四逆汤组主动脉病理检查结果比较

Table 1. The comparisons of pathological changes of aorta between model group and Sini decoction group ($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	主动脉斑块面积比(%)	内膜斑块厚度(μm)	内膜面积(μm ²)	内膜斑块面积与 中膜斑块面积比
模型组	8	34.79±9.71	30.86±13.59	3 093.16±873.62	0.72±0.39
四逆汤组	8	9.32±5.41 ^a	8.37±6.13 ^a	867.67±636.71 ^a	0.15±0.12 ^a

a: $P < 0.01$, 与模型组相比。

2.2 血和血管超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量的变化

模型组血超氧化物歧化酶活性显著低于正常对照组, 血浆丙二醛含量则显著高于正常组(P 均 < 0.05); 与模型组相比, 四逆汤组血超氧化物歧化酶活性明显提高, 血浆丙二醛含量降低(P 均 < 0.05) (表 2, Table 2)。血超氧化物歧化酶活性和血浆丙二醛含量的关系, 两者之间呈负相关($r = -0.743$, P

$= 0.035$)。

模型组血管超氧化物歧化酶活性显著低于正常对照组, 血管组织丙二醛含量则显著高于正常对照组($P < 0.05$); 与模型组相比, 四逆汤组明显提高血管组织超氧化物歧化酶活性, 降低血管组织丙二醛含量(P 均 < 0.05) (表 2, Table 2)。模型组血管组织超氧化物歧化酶活性和血管组织丙二醛含量的关系, 两者之间呈负相关($r = -0.798$, $P = 0.029$)。

表 2. 各组动物超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的变化

Table 2. The change of SOD activity and MDA concentration in various groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	超氧化物歧化酶活性		丙二醛含量	
	血(ku/L)	血管(u/100 mg 组织)	血浆(mmol/L)	血管(nmol/100 mg 组织)
正常组	182.28 $\pm$ 33.46	71.17 $\pm$ 41.56	4.39 $\pm$ 0.61	62.32 $\pm$ 9.21
模型组	192.72 $\pm$ 12.76 ^a	45.19 $\pm$ 21.08 ^b	6.58 $\pm$ 1.10 ^b	152.97 $\pm$ 19.31 ^b
四逆汤组	260.47 $\pm$ 10.33 ^{bd}	140.05 $\pm$ 55.91 ^{bd}	4.44 $\pm$ 0.42 ^d	108.65 $\pm$ 14.47 ^{bc}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与正常组相比; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与模型组相比。

2.3 四逆汤对主动脉壁超氧化物歧化酶蛋白表达的影响

正常组和四逆汤组动脉超氧化物歧化酶内膜多为强阳性表达, 少部分中度阳性表达, 两组之间表达无差异。模型组动脉内膜层中度阳性表达和弱阳性表达各占一半。3 组相比, 模型组动脉内膜超氧化

物歧化酶表达最弱, 有显著性差异($P < 0.05$) (表 3, Table 3)。

正常组和四逆汤组动脉超氧化物歧化酶中膜平滑肌层表达为中等阳性和弱阳性, 模型组表达较弱, 但 3 组之间统计学上无明显差异($P > 0.05$) (表 3, Table 3)。

表 3. 各组血管内膜和中膜超氧化物歧化酶蛋白表达

Table 3. The expression of SOD protein in intima and media among three groups

指数	内 膜			中 膜		
	正常组	模型组	四逆汤组	正常组	模型组	四逆汤组
例数	8	8	8	8	8	8
阴性	0	0	0	2	3	1
弱阳性	0	4	1	2	4	3
中度阳性	3	4	3	4	1	4
强阳性	5	0	4	0	0	0

内膜项 3 组比较, $\chi^2 = 11.04$, $P = 0.004$; 中膜项 3 组比较, $\chi^2 = 2.516$, $P = 0.284$ 。

2.4 四逆汤对主动脉壁超氧化物歧化酶基因表达的影响

超氧化物歧化酶基因表达, 正常组动脉内膜阴性率高, 模型组内膜层除 2 例外, 其余均为弱阳性表达, 四逆汤组中度以上阳性表达占 50%, 3 组相比有显著性差异(表 4, Table 4)。

正常组动脉中膜平滑肌层超氧化物歧化酶基因表达明显增强, 无 1 例阴性, 中度以上占 50%; 模型组动脉平滑肌层超氧化物歧化酶基因表达有 1 例阴

性, 中度以上为 3 例; 四逆汤组平滑肌层超氧化物歧化酶基因表达, 大多数为中度以上阳性。3 组相比有显著性差异(表 4, Table 4)。

3 讨论

本文实验结果表明, 高胆固醇饲料可导致家兔产生严重的动脉粥样硬化; 四逆汤对家兔实验性动脉粥样硬化的形成有显著的抑制作用, 用药组动物

表 4. 各组血管内膜和中膜超氧化物歧化酶基因表达

Table 4. The expression of SOD gene in aorta intima and media among three groups

指数	内 膜			中 膜		
	正常组	模型组	四逆汤组	正常组	模型组	四逆汤组
例数	8	8	8	8	8	8
阴性	4	2	1	0	1	0
弱阳性	3	6	3	4	4	1
中度阳性	0	0	2	3	2	2
强阳性	1	0	2	1	1	5

内膜项 3 组比较, $\chi^2 = 9.379$, $P = 0.009$; 中膜项 3 组比较, $\chi^2 = 6.579$, $P = 0.037$ 。

的主动脉病变程度轻, 斑块面积缩小, 内膜增厚明显减轻, 内膜的脂质斑块面积减少, 泡沫细胞数量少, 表明四逆汤具有抗动脉粥样硬化的效果。本研究结果与以往我们将该方用于抗动脉粥样硬化作用的研究结果相同^[4], 进一步证实四逆汤用于抗动脉粥样硬化是可行的。

近年来研究发现, 动脉粥样硬化的易患因素如高脂血症、高血压等, 使机体抗氧化能力降低(超氧化物歧化酶与谷胱甘肽过氧化酶等减少), 氧自由基产生过多, 脂质过氧化作用加强, 对血管细胞产生严重损伤作用^[5,6], 说明在动脉粥样硬化过程中, 存在着氧化和抗氧化失衡。其后果是: 氧化损伤直接造成血管细胞受损, 氧化修饰低密度脂蛋白, 形成氧化型低密度脂蛋白, 进入血管壁内皮下间隙, 易被单核细胞—巨噬细胞识别和吞噬, 形成泡沫细胞, 成为 As 复合病变的基础。我们的研究结果显示, 喂饲胆固醇成功建立了实验性动脉粥样硬化模型, 与正常组相比, 兔血清和血管丙二醛水平明显升高; 血和血管超氧化物歧化酶活性明显降低; 血、血管超氧化物歧化酶活性与丙二醛含量均呈负相关。说明喂饲高胆固醇造成动脉粥样硬化形成过程中, 氧化损伤十分明显。本实验结果与以往报道一致^[5,7]。

抗氧化剂能产生抗动脉粥样硬化作用, 如抗氧化剂普罗布考就可抑制血管氧化损伤时自由基的产生, 抑制低密度脂蛋白的氧化, 减轻和减缓动脉粥样硬化的形成。四逆汤是汉代医圣张仲景在《伤寒杂病论》中用于治疗少阴虚寒证的主方, 多年来我们应用四逆汤来保护缺血心肌。通过一系列研究发现^[1,2], 四逆汤能促进超氧化物歧化酶基因表达, 提高该酶活性, 有效清除氧自由基, 抑制脂质过氧化, 具有较强的降低机体氧化应激反应的作用, 表明四逆汤是具有抗心肌氧化损伤作用较佳的药物。四逆

汤在动脉粥样硬化模型中是否同样具有抗氧化损伤的效果呢? 本研究结果显示, 四逆汤能提高兔血超氧化物歧化酶活性, 降低兔血浆丙二醛水平, 与以往研究结果相同^[4]。本研究进一步证实, 四逆汤能明显降低高胆固醇喂饲后血管丙二醛水平, 提高血管超氧化物歧化酶活性, 表明四逆汤能够通过提高超氧化物歧化酶活性, 增强机体全身和和血管局部抗氧化能力, 降低机体和血管氧化损伤, 减轻动脉粥样硬化形成。同时也提示抗血管氧化损伤可能是四逆汤防治动脉粥样硬化的重要机制。

超氧化物歧化酶对机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用, 此酶能清除氧自由基, 保护细胞免受损伤。本研究发现, 高胆固醇组血管超氧化物歧化酶基因转录减少, 超氧化物歧化酶蛋白表达减少, 表明在动脉粥样硬化形成过程中, 在分子水平上, 血管抗氧化能力也已减小; 而四逆汤能够通过增加血管超氧化物歧化酶基因表达, 维持血管超氧化物歧化酶蛋白表达, 表明四逆汤可从分子水平加以调节, 提高血管对高脂胆固醇氧化损伤的对抗能力。

[参考文献]

- [1] 吴伟康, 侯 灿, 罗汉川. 四逆汤清除氧自由基及抑制心肌脂质过氧化反应的体外实验. 中国中药杂志, 1995, **20** (11): 68-69
- [2] 吴伟康, 侯 灿, 罗汉川, 谢全锦. 四逆汤の心筋保护作用に关する实验. 中西医结合, 1995, **11** (3): 68-70
- [3] Edelman ER. Vessel size, antioxidants, and resterosis, never too small, not too little, but often too late. *Circulation*, 1998, **97** (4): 416-420
- [4] 黄河清, 吴伟康, 程 超. 四逆汤抗实验性动脉粥样硬化的作用及机制研究. 中国动脉硬化杂志, 2000, **8** (4): 302-304
- [5] Terentis A, Thomas S, Burr J, Liebler D, Stock R. Vitamin E oxidation in human atherosclerotic lesions. *Circ Res*, 2002, **90** (3): 333-339
- [6] Steinberg D, Witztum J. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to refute the hypothesis? *Circulation*, 2002, **30** (17): 2 107-111
- [7] 刘 塞, 仲伟珍, 张 健, 刘占涛. 牡蛎提取物对鹌鹑实验性动脉粥样硬化的抑制作用及机制. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (2): 97-100

(此文编辑 曾学清)