

补肾宁心方对去势高脂血症家兔主动脉血管细胞粘附分子 1 表达的调节

郝群, 李大金, 朱影, 袁敏敏, 王明雁, 孟毅

(复旦大学附属妇产科研究所生殖免疫室, 上海市 200011)

[关键词] 中药学; 中药预防动脉粥样硬化; 家兔去势高脂血症模型; 补肾宁心方; 动脉粥样硬化; 卵巢切除术; 血管细胞粘附分子 1

[摘要] 为了探讨补肾宁心方对去势雌兔动脉粥样硬化形成的影响及其可能的机制, 将 26 只 3 月龄新西兰雌兔随机分为正常对照组、假手术组、去势对照组和治疗组(卵巢切除并灌以补肾宁心中药复方), 除正常对照组外均于术后 2 周给予高脂饮食, 治疗组同时灌胃给药, 连续 3 个月。12 周末测定血清总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平; 取主动脉行组织形态学及扫描电镜观察, 并应用免疫组织化学方法检测主动脉血管细胞粘附分子 1 的蛋白表达。结果发现, 与去势对照组比较, 补肾宁心方对血脂变化无明显影响, 但能明显降低主动脉粥样斑块面积与动脉内膜比值, 降低内膜中膜厚度比, 减轻主动脉病理损害, 抑制主动脉血管细胞粘附分子 1 的蛋白表达。结果提示, 补肾宁心方可能通过抑制主动脉血管细胞粘附分子 1 的表达从而阻止动脉粥样硬化的发生发展。

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

Effects of Bu-shen-ning-xin Recipe on the Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression of Aorta in Ovariectomized Rabbits of Hyperlipemia

HAO Qun, LI Da-Jin, ZHU Ying, YUAN Min-Min, WANG Ming-Yan, and MENG Yi

(Laboratory of Reproductive Immunology, Institute of Obstetrics & Gynecology, Fudan University, Shanghai 200011, China)

[KEY WORDS] Bu-shen-ning-xin Recipe; Atherosclerosis; Ovariectomy; Vascular Cell Adhesion Molecule-1; Rabbit; Hyperlipemia

[ABSTRACT] **Aim** To study effects of the Bu-shen-ning-xin recipe on atherosclerosis of ovariectomized rabbits and its possible mechanism. **Methods** Twenty-six female New Zealand white rabbits of three months old were randomly divided into normal group, sham operation group, ovariectomized group and treatment group in which the rabbits were ovariectomized and afforded with Bu-shen-ning-xin decoction. All of rabbits, except normal control, were given high-cholesterol diet two weeks after operation, the treatment group was given additionally by the medication. Twelve weeks later, serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL) and low density lipoprotein cholesterol (LDL) levels were measured in routine. The aortas were collected for histomorphometrical evaluation with light and scanning electron microscope. And the expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) was analyzed by immunohistochemical techniques. **Results** Following treatment for 12 weeks, no significant difference was found in serum TC, TG, HDL and LDL levels among three groups except the normal. The recipe could lower the area ratios of atherosclerotic lesion to endothelium and the thickness ratios of endothelium to the medium in treatment group compared with ovariectomized group. The pathologic damage of aortas were relieved and the expression of VCAM-1 protein in aortas were also significantly reduced following the recipe treatment. **Conclusion** The Bu-shen-ning-xin recipe could inhibit the VCAM-1 expression of aorta, which contributed to alleviate the pathologic progress of atherosclerosis of the ovariectomized rabbit.

妇女进入围绝经期后由于雌激素锐减心血管功能发生明显变化, 特别是动脉粥样硬化症(atherosclerosis, As)的发病率逐渐接近男性^[1]。激素替代

疗法(hormone replacement therapy, HRT)虽可改善更年期妇女的自主症状以及预防骨质疏松, 但由于其致癌的危险性限制了该法的广泛应用。国内外学者对于 HRT 能否降低心血管疾病的危险性褒贬不一, WHI 近期的一项研究报告显示^[2]: HRT 对心血管疾病的发生并无一级预防作用, 临床上不宜将预防心血管病列为 HRT 的适应症。因此开发我国中药可能成为治疗围绝经期病症的有效途径。本实验通过应用补肾宁心中药复方治疗去势雌兔动脉粥样硬化

[收稿日期] 2003-12-22 [修回日期] 2004-03-20

[基金项目] 上海市科技攻关项目(004019061)资助

[作者简介] 郝群, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为生殖—内分泌—免疫调节, 联系电话为 021-54230795, E-mail 为 haoqun0290@sina.com。李大金, 博士, 教授, 博士研究生导师, 为本文通讯作者, 电话为 021-63770161-386, E-mail 为 djli@shmu.edu.cn。

模型并探讨其作用机制,以期为中西医结合防治女性绝经后动脉粥样硬化提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 药物及主要试剂仪器

补肾宁心方药主要由生地 15 g、知母 15 g、黄柏 9 g、枸杞子 15 g、仙灵脾 12 g、酸枣仁 9 g 和泽泻 12 g 等组成,按该配方制成的水煎浓缩剂,每毫升含生药 3.7 g。总胆固醇(total cholesterol, TC)和甘油三酯(triglyceride, TG)测定试剂盒(上海张江生物医药股份有限公司),高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)测定试剂盒(上海北海生物试剂公司),兔抗血管细胞粘附分子 1(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1)多克隆抗体 IgG(武汉博士德生物工程有限公司),两步法通用型检测试剂盒(上海长岛抗体诊断试剂有限公司)。图像分析仪为上海申腾信息技术有限公司产品;扫描电镜型号为 Hitachi S-520。

1.2 动物模型的建立及分组

3 月龄雌性健康纯种新西兰兔 26 只,体重 2.0~2.4 kg,由中国科学院上海实验动物中心提供,适应性饲养一周后,随机分为正常对照组 6 只、假手术组 6 只、去势对照组 7 只和治疗组 7 只。除正常对照组和假手术组外,其余 2 组均经腹切除双侧卵巢;假手术组行假性手术,不切除卵巢。除正常对照组外各组均于术后 2 周饲以高脂饲料(胆固醇 0.5%、蛋黄粉 15%、猪油 5%和基础饲料 79.5%),治疗组同时灌服补肾宁心方水煎剂,每日灌胃 1 次,5 mL/kg,连续 12 周,其余各组均给予等量自来水灌胃。给予高脂饲料前及给药 12 周后,均留取空腹血清标本待测。给药 12 周末停药,经兔耳缘静脉空气栓塞处死,剪开心包,暴露心脏,16 号钝性注射针头自心尖刺向右上至主动脉根部,剪开右心耳,生理盐水以及 4%多聚甲醛溶液原位灌流固定。取其主动脉大体标本,置于 4%多聚甲醛溶液中固定;取降主动脉弓前壁行扫描电镜观察。

1.3 血脂检测

血清总胆固醇、甘油三酯、HDLC 和 LDLC 的检测采用全自动生物化学分析仪,步骤参照试剂盒说明书进行。

1.4 斑块/内膜面积比和血管内膜、血管中膜厚度的测定

主动脉大体标本(从近主动脉弓部到腹腔干分

支处)4%多聚甲醛溶液中浸泡固定 48 h 后,沿正中线剪开,流水浸洗 8 h,苏丹Ⅲ染色 30 min,75%乙醇浸泡 3 min,铺平,摄像。图像分析仪测定斑块面积及血管内膜总面积,并计算斑块/血管内膜面积比。

选取靠近主动脉弓部的降主动脉,置于 4%多聚甲醛溶液中浸泡 48 h。常规酒精脱水、石蜡包埋,将其横断面制成 3 μ m 厚连续切片,行 HE 染色。从 HE 染色片上随机选取 5 个视野,图像分析仪测定血管内膜及中膜厚度,并计算内膜/中膜厚度比。

1.5 扫描电镜观察

选取靠近主动脉弓部的降主动脉前壁,置于 2.5%戊二醛溶液中于 4℃初固定 24 h 以上,再给 1%锇酸固定,梯度脱水,临界点干燥,喷镀金膜后电镜观察。

1.6 免疫组织化学法检测血管细胞粘附分子 1 的表达

兔主动脉石蜡切片常规脱蜡水化,抗原修复液微波修复后 PBS 洗 3 次,每次 5 min。然后用 3%的过氧化氢浸泡 8 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。加兔抗 VCAM-1 常温下作用 90 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。加酶标二抗,常温下作用 30 min, PBS 洗 3 次,每次 5 min。加 DAB 显色 3~5 min,观察结果。苏木素复染,中性树胶封片。正常对照组用正常兔免疫球蛋白代替一抗孵育切片,余步骤同上。采用图像分析仪进行主动脉 VCAM-1 表达的半定量分析。

1.7 统计学方法

用 SPSS 统计软件进行统计学处理,组间比较采用方差分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 补肾宁心方对血脂的影响

除正常对照组外,各组血清 TC、TG、HDLC 和 LDLC 在饲以高脂饲料 12 周末均明显升高,但与去势对照组相比,补肾宁心方对去势雌兔血脂变化无明显影响(表 1, Table 1)。

2.2 补肾宁心方对主动脉病理损害的影响

肉眼观正常对照组内膜光滑,无斑块形成;去势对照组主动脉管壁有大量白色脂样物向管腔凸出,并连成片状;而假手术组与治疗组斑块明显减少,除近端外,较少连接成片,主要分布于血管分支处。HE 染色可见,去势对照组内膜显著增厚,斑块隆起明显,内含大量泡沫细胞;假手术组与治疗组的病变较去势对照组明显减轻。灌服补肾宁心方的治疗组及假手术组的斑块/内膜面积比、内膜厚度、内膜/中

膜厚度较去势组显著减少(表 2, Table 2, $P < 0.01$)。 1)。

表 1. 补肾宁心方对去势雌兔的血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 1. Effects of Bu-shen-ning-xin recipe on plasma lipid status of ovariectomized Rabbits

组 别	n	总胆固醇	甘油三酯	HDLc	LDLc
对照组	6	1.4 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.40 ± 0.0	0.63 ± 0.2
假手术组	6	32.1 ± 4.4	2.7 ± 1.0	1.89 ± 0.1	17.02 ± 4.4
去势组	7	31.7 ± 1.8	4.08 ± 2.1	1.85 ± 0.1	16.44 ± 6.4
中药组	7	33.6 ± 2.8	2.99 ± 1.2	1.88 ± 0.1	18.00 ± 4.0

表 2. 补肾宁心方对去势雌兔斑块面积、内膜厚度及血管细胞粘附分子 1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Effects of Bu-shen-ning-xin recipe on the atherosclerotic lesion area, the thickness of endothelium and the expression of VCAM-1 in ovariectomized rabbits

组 别	n	斑块/内膜面积	内膜厚度 (μm)	内膜/中膜厚度	VCAM-1
对照组	6	0	0	0	12.5 ± 2.6
假手术组	6	27.6% ± 6.2%	66.1 ± 20.6	24.6% ± 6.7%	15.7 ± 2.5
去势组	7	45.5% ± 8.3%	235.2 ± 124.5	49.4% ± 15.2%	29.0 ± 3.0
中药组	7	30.4% ± 5.7%*	61.6 ± 42.6*	23.6% ± 13.0%*	16.8 ± 2.6*

a: $P < 0.01$, 与去势对照组比较。

2.3 扫描电镜观察

扫描电镜显示正常对照组内皮细胞呈长梭形, 细胞长轴与血流方向一致, 胞核微隆起, 突向管腔, 内皮细胞完整性好, 排列整齐, 无缺损, 未见单核细胞粘附; 去势对照组较多区域内皮细胞脱落, 暴露内皮下胶原, 脱落区附近单核细胞大量粘附; 而灌服补肾宁心方的治疗组及假手术组内皮细胞脱落区明显减少, 周围仅有少量单核细胞粘附。

2.4 补肾宁心方对血管细胞粘附分子 1 蛋白表达的影响

血管细胞粘附分子 1 蛋白主要表达于血管内皮细胞以及粥样斑块的内膜和中膜部分泡沫细胞的胞膜与胞浆中。正常主动脉组织中血管内皮细胞 VCAM-1 蛋白表达微弱, 雌兔去势并饲以高脂饮食 12 周后主动脉血管内皮细胞 VCAM-1 蛋白表达明显升高。图像分析结果显示, 去势对照组雌兔的主动脉血管内皮细胞 VCAM-1 的蛋白表达最为明显, 与其余 3 组差异有显著性 ($P < 0.01$), 而补肾宁心方可明显降低去势雌兔主动脉血管内皮细胞 VCAM-1 的蛋白表达 ($P < 0.01$) (表 2 和图 1, Table 2 和 Figure

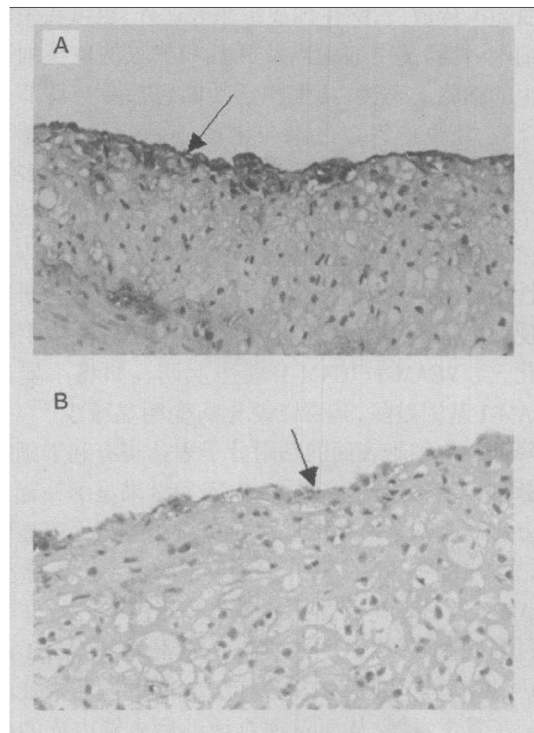


图 1. 补肾宁心方对去势雌兔主动脉壁表达血管细胞粘附分子 1 的影响 (免疫组织化学, $\times 400$) A 组为去势组主动脉壁表达血管细胞粘附分子 1 增高; B 组为补肾宁心方对主动脉壁表达血管细胞粘附分子 1 增高的抑制作用。

Figure 1. Effects of Bu-shen-ning-xin recipe on the VCAM-1 expression of endothelium in ovariectomized rabbits of hyperlipemia

3 讨论

本研究结果显示, 补肾宁心方能明显改善去势后由于雌激素水平下降所致的主动脉内皮的病理损害, 减轻病变部位胶原的暴露以及单核细胞的粘附, 减少动脉粥样硬化斑块的形成。提示补肾宁心方对绝经后血管内皮细胞具有良好的保护作用, 应用中药复方防治女性绝经后动脉粥样硬化不失为一条有效途径。

目前认为 As 是一种炎症性疾病^[3], 来自血液的炎性细胞 (主要为单核—巨噬细胞及淋巴细胞) 浸润至内皮下区域对于 As 的形成和发展是必须的, 该过程涉及到炎性细胞和内皮细胞之间诸多粘附分子的相互作用^[4]。迄今为止在 As 发病中研究最多, 并在人动脉粥样硬化斑块中检出、主要表达于内皮细胞的粘附分子有细胞间粘附分子 1 (intercellular adhe-

sion molecule-1, ICAM-1)、VCAM-1 和 E 选择素等^[5], 其表达受多种因素的影响^[6,7]。VCAM-1 是免疫球蛋白超家族成员,除在内皮细胞表达外,也可在平滑肌细胞、骨髓基质细胞以及肝脏和脾脏的单核细胞衍生的细胞上表达,其生物学功能包括参与调节炎症反应、免疫应答以及参与淋巴细胞归巢、再循环等。VCAM-1 的受体是整合素 $\alpha_4\beta_1$ 和表达于大多数单个核细胞上的极迟抗原 4。研究发现致 As 性脂蛋白可上调内皮细胞粘附分子的表达,并增加体外炎性细胞对内皮细胞的粘附^[8,9],此外动物实验研究发现载脂蛋白 E 缺陷的小鼠血管内皮易发生粥样硬化,且 VCAM-1、ICAM-1 表达上调。如将小鼠的 VCAM-1 基因敲除,其粥样硬化病变明显减少^[10],提示降低内皮细胞表面的粘附分子表达将有利于延缓动脉粥样硬化的发生发展。本实验结果显示补肾宁心方对高脂饮食所致的去势雌兔血脂升高无明显影响,但去势雌兔灌服补肾宁心方后,主动脉壁 VCAM-1 蛋白表达明显下调,提示补肾宁心方并非通过降低血脂,而是通过抑制主动脉壁 VCAM-1 的表达,抑制单核细胞对内皮细胞的粘附,阻止炎症的进一步发生发展,从而发挥对绝经后血管内皮的保护作用。在本实验中,去势雌兔灌服补肾宁心方后,动脉粥样硬化斑块形成减少的同时 VCAM-1 表达下调,提示主动脉壁 VCAM-1 的表达可能与动脉粥样硬化斑块形成存在着某种相关性,尚有待于进一步证实。

肾虚是女子绝经期及其之后各种病理改变的基础,绝经后动脉粥样硬化的发病机理,可用“其本在肾,其标在心”来概括,故治疗应以补肾阴益精血为主^[11]。补肾宁心方中的生地、枸杞子滋阴补血,益

精填髓;仙灵脾补肾壮阳;酸枣仁宁心安神;知母黄柏生津润燥,泻火除蒸;泽泻清热利湿。全方阴阳并补而以养阴为主,且补中有泻,敛中有散,较好地针对绝经后妇女的临床实际的证候表现。本实验提示以补肾中药为主要成分的补肾宁心方对绝经后血管内皮细胞具有保护作用,为临床上使用补肾中药防治绝经后动脉粥样硬化症提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Nathan L, Chaudhuri G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, 37 (4): 477-515
- [2] Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risk and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 2002, 288 (3): 321-333
- [3] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med*, 1999, 340 (2): 115-126
- [4] 蔡强军,陈纪林. 单核-内皮细胞相互作用与动脉粥样硬化研究进展. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (1): 83-85
- [5] 张新超,徐成斌. 细胞粘附分子在动脉粥样硬化发生发展中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 1999, 7 (2): 179-184
- [6] 李启富,张先祥,何军,栗绍初,舒昌达,张寰华. 格列美酮降低 2 型糖尿病患者血清 E 选择素和血管细胞粘附分子 1 水平. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (2): 167-168
- [7] 舒春兰,周临生,霍小勇,成元柱. 氟伐他汀对高脂血症患者的血脂及细胞粘附分子的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (1): 62-64
- [8] Ragab MS, Selvaraj P, Sgoutas DS. Oxidized lipoprotein(a) induces cell adhesion molecule MAC-1 (CD11b) and enhances adhesion of the monocytic cell line U937 to cultured endothelial cells. *Atherosclerosis*, 1996, 123 (1-2): 103-113
- [9] Lehr HA, Krombach F, Munzing S, Bodlaj R, Glaubitt SI, Seiffge D, et al. In vitro effects of oxidized low density lipoprotein on CD11b/CD18 and L-selectin presentation on neutrophils and monocytes with relevance for the in vivo situation. *Am J Pathol*, 1995, 146 (1): 218-227
- [10] Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18 (5): 842-851
- [11] 黄帝内经素问. 北京: 人民卫生出版社, 1979; 334-336

(此文编辑 朱雯霞)