

痰瘀同治方对实验性动脉粥样硬化家兔 主动脉、心肌及内皮细胞形态学的影响

韩学杰, 张立石, 沈绍功, 侯燕鸣

(中国中医研究院基础理论研究所, 北京市 100700)

[关键词] 中医学; 痰瘀同治方对动脉粥样硬化的影响; 形态学观察; 动脉粥样硬化; 主动脉; 心肌; 内皮细胞

[摘要] 观察痰瘀同治方对实验性动脉粥样硬化家兔主动脉、心肌及内皮细胞形态学的影响。采用高脂饲料制造家兔动脉粥样硬化模型, 再给痰瘀同治方大、中、小剂量治疗, 观察各组主动脉及心肌变化。之后体外内皮细胞培养, 以高脂血清损伤内皮细胞, 再给痰瘀同治方及不同剂量冠心^①号方, 观察内皮细胞形态学变化。结果发现, 扫描电镜下, 痰瘀同治方大剂量组主动脉内膜较光滑, 动脉硬化斑块的形成明显减少, 内皮细胞排列较密集规整, 细胞间隙未见开大, 细胞形态恢复, 多为长梭形, 其内膜表面的变化基本趋向正常。透射电镜下, 痰瘀同治方组大剂量组心肌原纤维排列较规整, 肌节排列亦较为整齐, 明暗带分明, 未见肌丝溶解, 肌浆网扩张明显减少。倒置相差显微镜显示, 痰瘀同治方小剂量组内皮细胞形态规整, 细胞碎片减少, 呈多角形和短梭形。荧光显微镜下内皮细胞呈淡蓝色椭圆形, 染色均匀, 亮度一致, 可见少数凋亡及坏死的红染细胞。电镜下痰瘀同治方小剂量组内皮细胞形态与正常组相似, 表面粗糙, 微绒毛变短。结果提示, 痰瘀同治方有明显减轻主动脉粥样硬化及改善心肌缺血缺氧状态, 对血管内皮及细胞损伤有明显的保护作用。

[中图分类号] R2

[文献标识码] A

The Effect of Recipe of Removing Both Phlegm and Blood Stasis on Aorta and Cardiac Muscle of Rabbits as well as Ultrastructure of Endothelial Cells

HAN Xue-Jie, ZHANG Li-Shi, SHEN Shao-Gong, and HOU Yan-Ming

(Institute of Basic Theory, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Aorta; Myocardium; Endothelial Cell; Recipe of Removing Both Phlegm and Blood Stasis; Platelet Aggregation

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of Recipe of Removing Both Phlegm and Blood stasis on aorta and cardiac muscle of rabbits as well as ultrastructure of endothelial cells. **Methods** The rabbits were fed with high fat diet in order to reproduce hyperlipemia models; The endothelial cells were cultured in high fat serum to observe the effect of hyperlipemia on it. They were treated by two kinds of recipes. In this experiment the ultrastructure of endothelial cells (EC), aorta and cardiac muscle was observed through electron microscope. **Results** Recipe of Removing Both Phlegm and Blood stasis group: Smooth tunica intima of aorta, little formation sclerosis plaque of aorta, dense and regular arrangement of endothelial cells, recovered cell appearance, regular arrangement of cardiac muscle, slight adipose tissue infiltration in cardiac muscle, no myofilament solution and decrease of expansion of sarcoplasmic reticulum. The results showed that recipe prevented EC, aorta and cardiac muscle from injury.

Conclusion Recipe of Removing Both Phlegm and Blood stasis can be used against myocardial ischemia, prevent vasospasm, platelet aggregation and arteriosclerosis.

“痰瘀互结”形成高脂血症, 是冠心病心绞痛发生的主要病理因素。痰浊为脂质代谢紊乱, 瘀血为微循环功能障碍。痰瘀互结证(高脂血症)可致血管内皮损伤, 促使动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生, 痰瘀同治法是保护血管内皮, 祛除病理代谢产

物, 治疗冠心病心绞痛的重要法则, 是诊治冠心病心绞痛的新思路、新途径。本研究试从体内外实验寻找高脂血清损伤主动脉、心肌及内皮细胞形态的病理过程, 揭示高脂血症发病机理及痰瘀同治的作用机制。

[收稿日期] 2003-07-10

[修回日期] 2004-08-10

[基金项目] 国家中医药管理局 2000 年青年课题(2000-J-Q-03)

[作者简介] 韩学杰, 医学博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为中医治疗心血管病的临床与基础研究。张立石, 助理研究员, 研究方向为中药与细胞培养及形态学观察。沈绍功, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为中医药治疗急症的临床及基础研究。

1 材料与方法

1.1 实验药物及分组

痰瘀同治方为全瓜蒌 30 g, 薤白 10 g, 水蛭 5 g 等水煎剂, 按人一兔等效剂量 4、8 及 16 倍给药。

小、中、大剂量组水浴浓缩分别为 2.6 kg/L、5.1 kg/L 及 10.2 kg/L。冠心④号方为降香 15 g, 红花 15 g, 赤芍 15 g 等水煎剂, 小、中、大剂量组水浴浓缩分别为 3.4 kg/L、6.8 kg/L 及 13.6 kg/L。

1.2 高脂血症及动脉粥样硬化家兔模型的建立

选择新西兰健康大耳白兔 40 只, 体重 2.0~2.5 kg, 雌雄兼用。由中国药品生物制品检定所实验动物繁育场提供[合格证号为京动管质字(1994)第 064 号], 随机分为 5 组。正常组喂基础饲料; 模型组^[1]在 80% 基础饲料中加入 15% 蛋黄粉、1% 胆固醇和 5% 猪油喂饲共 6 周; 痰瘀同治方小、中、大剂量组先以基础饲料喂饲 2 周, 以后每天喂高脂饲料加小、中、大剂量痰瘀同治方, 喂饲 4 周。实验结束前, 自模型组和治疗组家兔耳缘静脉注射垂体后叶素 2 u/kg, 造成家兔高脂血症急性心肌梗死模型。

1.3 高脂血清损伤的内皮细胞模型^[2]

1.3.1 细胞培养和传代 将传代培养的人脐静脉内皮细胞株 ECV304(武汉大学典型物保藏中心提供)培养于含 15% 小牛血清(Gibco 公司)的 DMEM 培养基。用 0.25% 胰蛋白酶 0.02 g 与 100 mL EDTA (1:1)消化传代。接种于 100 mL 培养瓶中, 送入 5% CO₂ 培养箱中培养。以备实验用。

1.3.2 高脂血清模型制备 正常内皮细胞培养 24 h, 加入高脂血清(胆固醇含量 3929.7 mg/dL), 按等比浓度逐渐稀释, 继续培养 24 h。检测内皮细胞半数抑制率的高脂浓度(胆固醇含量 61.4 mg/dL), 设定 31.2 mg/dL 高脂血清为造模浓度。

1.3.3 含药血清的制备 痰瘀同治方小、中、大剂量组, 按人一兔等效剂量 4、8 和 16 倍给药。对照组及冠心④号方小、中、大剂量组, 连续灌胃 3 天, 每日一次。末次给药后 2 h, 自家兔耳缘静脉取血, 分离血清(注意溶血), 0.22 μm 微孔膜滤器过滤, 无菌分装, 低温(-30℃)冷藏, 以备试验用。

1.4 内皮细胞检测

倒置相差显微镜及荧光显微镜下观察内皮细胞形态、数量及分布。电镜下观察其超微结构。传代的人内皮细胞生长成单层时, 用 0.25% 胰蛋白酶与 0.04% EDTA 等量混合消化单层细胞 1 min, 离心去上清液。加 2.5% 戊二醛固定 2 h, 进行常规扫描电镜制样后, 扫描电镜样品经临界点干燥、离子镀膜制成后, 于日电 JSM-J300 型扫描电镜观察。

1.5 病理学检查

空气栓塞处死实验动物, 迅速分离心脏及主动脉至髂总动脉分叉下 1 cm 处, 从主动脉弓根部及心脏的左心室分别取材约 2.0 cm × 2.5 cm 及 1.0 cm × 1.5 cm, 迅速用 0.1 mol/L PBS 冲洗, 2.5% 戊二醛固定, 按常规扫描与透射电镜样品制备方法, 用 S520 型扫描(日立)及 H600 型透射(日立)电镜观察主动脉及心肌。

1.6 统计学处理

各组间差异分析采用单因素方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 主动脉病理变化

扫描电镜下, 正常组主动脉内膜的内皮细胞呈长梭形, 密集平行排列, 细胞大小均匀, 顺着血流方向排列, 形态规整。高脂模型组完全失去了内皮细胞平行密集有序的排列方式, 表面粗糙, 细胞肿胀, 脂肪颗粒及空泡增多, 内皮细胞形态损伤明显, 细胞大小不一, 多呈球形和不规则形, 边缘不清晰, 极少见到正常长梭形的细胞。痰瘀同治方组小剂量组内皮细胞欠规整, 可见少数形态损伤的内皮细胞, 呈球形或不规则形, 有的伸出细长的突起, 表面粘附脂肪颗粒; 中剂量组内皮细胞排列较规整, 表面粘附少量脂肪颗粒; 大剂量组内皮细胞排列密集规整, 细胞间隙未见开大, 细胞形态恢复, 多为长梭形, 其内膜表面的变化基本趋向正常(图 1, Figure 1)。

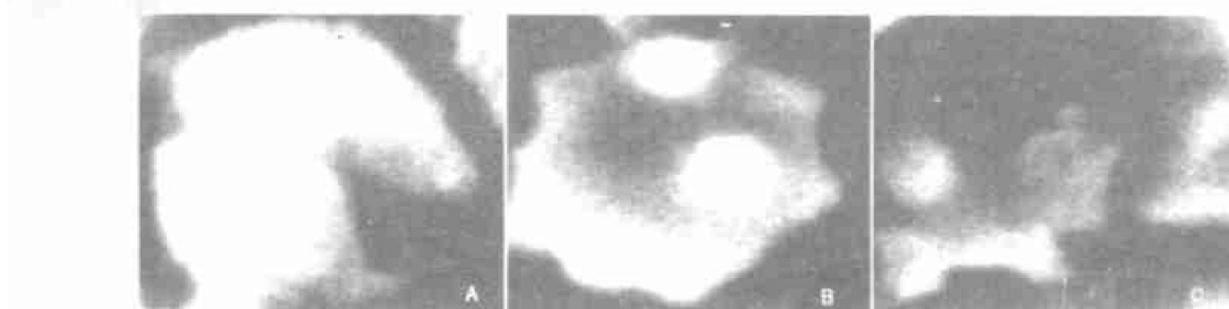


图 1. 扫描电镜下主动脉 (×1 500) A 为正常组, B 为模型组, C 为痰瘀同治方大剂量组。

Figure 1. Aorta structure by scanning electron microscope

2.2 心脏病理变化

透射电镜下,正常组可见心肌肌原纤维排列整齐,肌节长度一致、排列规整,肌丝清晰;细胞核发育良好,核周围有大量线粒体;线粒体结构清晰,无肿胀及空泡样变、水样变等。模型组心肌肌原纤维排列紊乱,肌节缩短,排列不规整,肌丝溶解、消失,肌浆网扩张;可见细胞核异形变,线粒体肿大,甚至嵴断裂溶解呈空泡样变,闰盘排列紊乱,有断裂现象。痰瘀同治方小剂量组心肌肌原纤维排列较紊乱,肌

节变短,欠规整,肌丝部分溶解,肌浆网轻度扩张,线粒体轻度肿大;中剂量组心肌肌原纤维排列较规整,肌节排列亦较为整齐,明暗带分明,肌丝溶解较模型组明显减少,肌浆网扩张明显减少;大剂量组心肌肌原纤维排列规整,肌节排列亦整齐,明暗带分明,细胞核发育良好,核仁明显,核周可见大量丰富的发育良好的线粒体。细胞核完整。未见肌丝溶解、肌浆网扩张(图 2, Figure 2)。

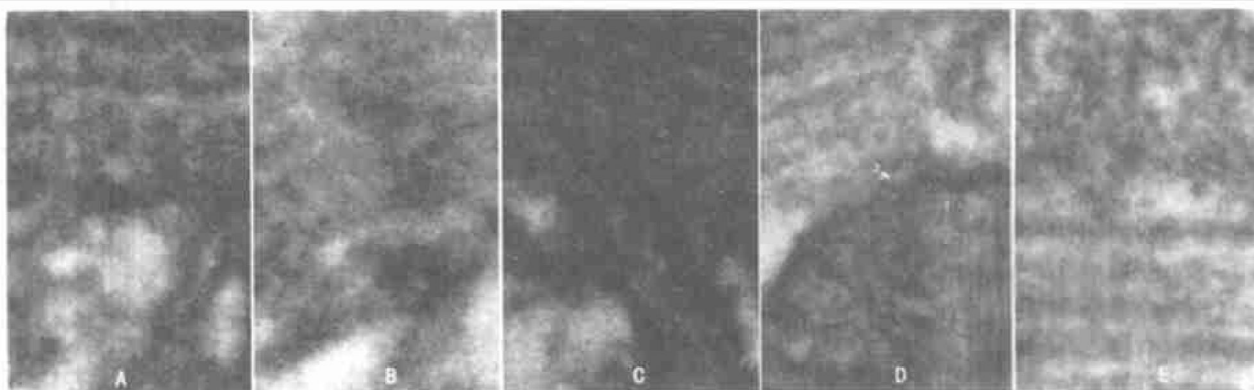


图 2. 透射电镜下心肌 ($\times 15\,000$) A 为正常组, B 为模型组, C 为痰瘀同治方小剂量组, D 为痰瘀同治方中剂量组, E 为痰瘀同治方大剂量组。

Figure 2. Cardiac muscle by transmission electron microscope

2.3 内皮细胞形态学变化

正常组倒置相差显微镜见内皮细胞呈扁平的短梭形或多角形,还可见到一些较大的椭圆形细胞,呈铺石样镶嵌排列,界限清楚,彼此不重叠。荧光显微镜下内皮细胞呈淡蓝色椭圆形,呈铺石样镶嵌排列,形态规整,界限清楚,可见极少数坏死红染细胞。扫描电镜下内皮细胞为梭形、多角形,连接呈单层,胞体表面有密度较一致规整的微绒毛突起和分支,与邻近细胞连接。高脂模型组相差显微镜见内皮细胞收缩变形,细胞间隙开大,重者细胞变小并伸出细长突起,有的甚至彼此分离,重者缩为球形、脱落、自溶,贴壁细胞减少,残存细胞多孤立存在。荧光显微镜下细胞数目减少,碎片增多,多呈不规则形,可见凋亡小体,红染的死亡细胞增多。扫描电镜下细胞体积缩小、变形,表面微绒毛短缩,疏密不均,可融合成片或消失呈凸凹不平状,细胞表面形成多数指状和球状胞膜突起,胞核影像不清,细胞散在。倒置相差显微镜显示痰瘀同治方小剂量组细胞形态规整,细胞碎片减少,呈多角形和短梭形;中剂量组细胞排列规整,死亡数目较正常增多,有少数细胞呈不规则形,可见凋亡小体;大剂量组细胞空隙增大,数目减少,细胞形态不规则,有少量凋亡小体。荧光显微镜

下小剂量组细胞呈淡蓝色椭圆形,染色均匀,亮度一致,可见少数凋亡及坏死的红染细胞。其它组细胞碎片较多,细胞数目减少,收缩变形,细胞间隙较大,脱落,碎片增多。电镜下小剂量组细胞形态与正常组相似,表面粗糙,微绒毛变短。冠心 ①号方小剂量组倒置相差显微镜显示细胞形态规整,呈多角形和短梭形,有少量死亡细胞;中剂量组细胞碎片增多,死亡数目较正常组增加;大剂量组细胞收缩变形,间隙较大,脱落,碎片及死亡细胞明显增多。荧光显微镜下小剂量组细胞呈淡蓝色椭圆形,染色均匀,亮度一致,有少量凋亡小体及坏死的红染细胞;中剂量组细胞间隙较大,死亡数目增多,细胞分布不均匀,可见凋亡小体;大剂量组细胞分布不均匀,数目减少,多呈不规则形,凋亡小体及死亡细胞数增加。电镜下小剂量组细胞呈不规则形,绒毛可融合成片或消失(图 3, Figure 3);中剂量及大剂量组细胞已破碎,无法观察。

3 讨论

医学研究认为高脂血症(主要为高胆固醇血症)是 As 病变最重要的原因。内皮细胞损伤(多半是功能性损伤)是 As 发生的启动步骤,其功能降低主要

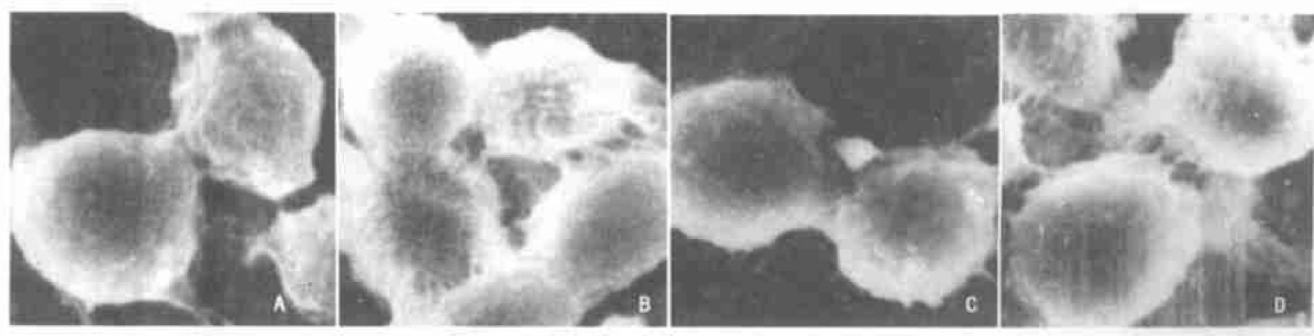


图3. 扫描电镜下内皮细胞 ($\times 15\ 000$) A 为正常组, B 为模型组, C 为痰瘀同治方小剂量组, D 为冠心 ⑩号方小剂量组。

Figure 3. Endothelial cell by scanning electron microscope

表现在正常的抗凝、抗细胞粘附和抗氧化机能减弱^[3]。最早的临床病理形态变化是动脉内膜中有脂质沉积,继之内膜纤维结缔组织增生,引起内膜局限性增厚,形成斑块,以后在其深部发生溃疡,软化而形成粥样物质。临床上,当其发生在管腔较小的动脉就会引起血液供应障碍^[4]。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,导致大量的低密度脂蛋白被氧化;另一方面,高胆固醇血症又直接损伤动脉壁的抗氧化机能,使动脉壁内的超氧化物歧化酶活性降低,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,加重局部血管内皮细胞的病理损伤和血管调节失常^[5],导致功能降低和紊乱,出现内皮功能障碍^[6]。内皮细胞损伤是由痰致瘀、痰瘀互结的主要病理特征,而脂质代谢紊乱及微循环功能障碍引起其紊乱的内外因素是它们的病因所在。

细胞模型是目前基础研究中能够与整体动物实验互补且更具优势的一种研究手段。用培养的细胞造成细胞损伤模型,可用来直接观察生活状态下细胞的形态功能变化,既能够模拟活体细胞的一系列病理及生物化学改变,又具有条件可控、样本均一可比的优点^[7]。本研究结果发现,高脂血清可引起内皮细胞凋亡,其程度与凋亡比例呈正相关。运用中药保护损伤的内皮细胞,在一定范围内减少凋亡的发生率。流式细胞仪检测显示,凋亡比例随高脂血清及中药量的增加而递增,表现为 DNA 峰前的荧光道上大量碎片,说明细胞损伤较重,造成细胞坏死。

这与长时间严重缺氧缺血使内皮细胞发生急性坏死有关。还发现具有增殖能力的细胞系中,缺血性损伤也引起细胞周期的变化,表现为细胞增殖受抑制,细胞分裂停止(S 期峰值降低, G₂ 期静止)。本研究针对心血管疾病发生后最基本的病理损害——高脂血症、缺氧/缺血,在细胞水平上建立了稳定的凋亡模型,该模型对凋亡的比率具有理想的控制性,为进一步研究药物对凋亡的干预作用打下了基础,也可作为抑制凋亡作用的药物筛选模型。缺氧/缺血培养引起内皮细胞凋亡的机制有多种,如钙超载、脂代谢紊乱和自由基产生、免疫机制参与、血管活性物质过度释放、基因调控等,其具体衍变及相互间作用规律的研究尚在进行中。

本实验结果证实,痰瘀同治方具有极强的防止内皮细胞损伤,减轻血管内膜脂斑形成和改善心肌细胞的作用。因此,此方有抗氧化,减少脂质在血管沉积作用,保护血管内皮,在高脂血症及动脉硬化的防治中起重要作用。

[参考文献]

- [1] 李仪奎. 《中药药理实验方法学》. 上海科技出版社, 1998; 100-103
- [2] 赵卫红. 《细胞凋亡》. 河南医科大学出版社, 1997; 115-124
- [3] 徐也鲁. 动脉粥样硬化——一种慢性炎症过程. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (2): 93-95
- [4] Xeaney JF, Jr Vita JA. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant, protection. Prog Cardiovasc Dis, 1995, 38 (2): 129-148
- [5] 曹洪欣, 殷慧军, 张 藤. 温心胶囊抗动脉粥样硬化的形态学研究. 中国中医药科技, 2001, 8 (1): 39
- [6] 李建军. 血管内皮功能障碍及其检测与防治. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9 (2): 175-178
- [7] 何丽云, 崔 巍, 范吉平. 流式细胞仪检测缺氧/缺血神经细胞凋亡的研究. 中国中医基础医学杂志, 2000, 6 (11): 39-41

(此文编辑 文玉珊)