

## 何首乌总甙抑制动脉粥样硬化病变形成

方微<sup>1</sup>, 张慧信<sup>1</sup>, 王绿娅<sup>2</sup>, 秦彦文<sup>2</sup>, 刘斌<sup>3</sup>, 武迎<sup>1</sup>, 何继强<sup>1</sup>, 王伟<sup>1</sup>, 杜兰平<sup>2</sup>

(1. 北京安贞医院, 2. 北京市心肺血管疾病研究所, 3. 北京中医药大学, 北京市 100029)

[关键词] 药理学; 何首乌总甙的药理作用; 血脂; 脂蛋白; 载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠; 动脉粥样硬化/治疗

[摘要] 目的 研究何首乌总甙对载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠实验性动脉粥样硬化病变形成的保护作用。方法

将载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠随机分为 4 组: 何首乌总甙高剂量组[150 mg/(kg·d)]、低剂量组[25 mg/(kg·d)]、阿托伐他汀阳性药物组[5 mg/(kg·d)]及空白对照组, 给药第 10 周后全部处死, 酶法检测四组血清脂质含量, 图象分析法测定主动脉粥样硬化斑块面积和管腔面积, 计算斑块面积与管腔面积的比值。结果 (1) 何首乌总甙高、低剂量组及阳性药物组总胆固醇分别为  $649.3 \pm 72.2$  mg/dL、 $632.6 \pm 55.1$  mg/dL 和  $497.4 \pm 140.8$  mg/dL, 均显著低于空白对照组( $809.4 \pm 42.6$  mg/dL,  $P < 0.01$ ); 甘油三酯分别为  $126.6 \pm 48.1$  mg/dL、 $145.6 \pm 37.9$  mg/dL 和  $172.1 \pm 15.7$  mg/dL, 均显著低于空白对照组( $253.3 \pm 42.6$  mg/dL,  $P < 0.01$ ); 而高密度脂蛋白胆固醇分别为  $117.1 \pm 14.9$  mg/dL、 $113.5 \pm 23.3$  mg/dL 和  $126.7 \pm 12.8$  mg/dL, 均显著高于空白对照组( $67.3 \pm 10.6$  mg/dL,  $P < 0.01$ ); 治疗组间无显著性差异( $P > 0.05$ )。 (2) 何首乌总甙高剂量组、低剂量组及阳性药物组载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠主动脉粥样硬化病变减轻且动脉粥样硬化斑块面积/管腔面积比值分别为  $3.97\% \pm 0.62\%$ 、 $3.11\% \pm 0.01\%$  和  $0.86\% \pm 0.07\%$ , 均小于空白对照组( $18.50\% \pm 6.54\%$ ,  $P < 0.05$ )。治疗组间无显著性差异( $P > 0.05$ )。结论 何首乌总甙可能通过调节载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠血脂代谢来减小及延缓主动脉斑块的形成, 起到防止载脂蛋白 E 基因缺陷小鼠实验性动脉粥样硬化病变形成的作用。

[中图分类号] R9

[文献标识码]

### The Inhibiting Effect of Polygonum Multiflorum Total Glycoside on the Atherosclerotic Lesion Formation

FANG Wei<sup>1</sup>, ZHANG Hui Xin<sup>1</sup>, WANG Lu Ya<sup>2</sup>, QIN Yan Wen<sup>2</sup>, LIU Bin<sup>3</sup>, WU Ying<sup>1</sup>, HE Ji Qiang<sup>1</sup>, WANG Wei<sup>1</sup>, and DU Lan Ping<sup>2</sup>

(1. Department of Pathology, Beijing Anzhen Hospital; 2. Department of Atherosclerosis, Institute of Beijing Heart and Lung diseases; 3. Department of Cardiovascular diseases, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Polygonum Multiflorum Total Glycosides; Serum Lipids; Apolipoprotein E Gene-Deficient Mice

[ABSTRACT] Aim To study the protecting effect of Polygonum Multiflorum total glycosides(PMTG) on the atherosclerotic lesion formation. Methods Thirty-two female apolipoprotein E gene deficiency mice were randomized into four groups: PMTG high dose group [150 mg/(kg·d)], low dose group [25 mg/(kg·d)], atorvastatin positive control group [5 mg/(kg·d)], and blank control group. At the end of the tenth week, all mice were killed. The serum levels of total cholesterol (TC), Triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL) were measured by enzyme dynamics method. Light microscopy were adopted to assess the degree of As lesions of aortic wall and image analysis was performed with computer. Results As compared with the blank control group, 1. PMTG could reduce the levels of serum TC, TG significantly (TC:  $649.3 \pm 72.2$  mg/dL,  $632.6 \pm 55.1$  mg/dL,  $497.4 \pm 140.8$  mg/dL vs  $809.4 \pm 42.6$  mg/dL, respectively,  $P < 0.01$ ; TG:  $126.6 \pm 48.1$  mg/dL,  $145.6 \pm 37.9$  mg/dL,  $172.1 \pm 15.7$  mg/dL vs  $253.3 \pm 42.6$  mg/dL, respectively,  $P < 0.01$ ); but elevate HDL level significantly( $117.1 \pm 14.9$  mg/dL,  $113.5 \pm 23.3$  mg/dL,  $126.7 \pm 12.8$  mg/dL vs  $67.3 \pm 10.6$  mg/dL, respectively,  $P < 0.01$ ). There are no differences between cured groups in the serum level of blood lipids ( $P > 0.05$ ). 2. It could also reduce the extent of atherosclerotic lesion and the aorta plaque areas were significantly lower ( $3.97\% \pm 0.62\%$ ,  $3.11\% \pm 0.01\%$ ,  $0.86\% \pm 0.07\%$  vs  $18.50\% \pm 6.54\%$ , respectively,  $P < 0.05$ ). Conclusion The resulting data provide the occurrence and the development of atherosclerotic lesions could be inhibited by the PMTG because of its lipid-regulated ability.

近年来,以天然中草药通过降脂治疗动脉粥样

硬化(atherosclerosis, As)已取得很好的疗效。何首乌总甙(polygonum multiflorum total glycoside, PMTG)的主要成分为二苯乙烯苷,证实该成分具有较强的抗氧化作用,而研究多集中于缺血性脑损伤、老年性痴呆等脑血管疾病方面<sup>[1-4]</sup>,而对其抗 As 作用的研究则

[收稿日期] 2004-04-13

[修回日期] 2004-11-24

[作者简介] 方微,硕士,主治医师,主要从事临床病理诊断及动脉粥样硬化实验病理研究。张慧信,主任医师,硕士研究生导师。王绿娅,副研究员,硕士研究生导师,研究方向为动脉粥样硬化。

少见报道。本研究利用载脂蛋白 E 基因缺陷(载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>)小鼠在体观察何首乌总甙对主动脉动脉粥样硬化病变形成的影响,以期进一步探讨何首乌可能的抗 As 作用环节,为全面了解该中药在预防与治疗 As 病变中所起的作用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与仪器

血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)试剂盒购自北京中生生物工程技术有限公司。CIMAS 多功能真彩色病理图像分析系统(版本 4.0)购自北京航空航天大学图像中心。OLYMPUS BX40 显微镜由日本制造。

### 1.2 实验动物与分组

32 只 8 周龄雌性载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠(购自北京大学医学部实验动物中心)随机分为 4 组:何首乌总甙高剂量组[150 mg/(kg·d)]、低剂量组[25 mg/(kg·d)]、阿托伐他汀阳性药物组[5 mg/(kg·d)]及空白对照组,每组 8 只。各组以相应药物灌胃,空白对照组灌等量生理盐水。给药时间 10 周,普通饮食饲养。

### 1.3 药物

何首乌总甙由河南驻马店产何首乌药材中可提取 4% 何首乌总甙,为干粉制剂,由北京中医药大学中药教研室刘斌博士提供。实验用高、低剂量的浓度分别是 10 g/L 及约 1.7 g/L。

### 1.4 血脂测定

眼眶取血,分别采用氧化酶法测定血清总胆固醇及甘油三酯;采用 PTA-Mg<sup>2+</sup> 沉淀法测定高密度脂蛋白。

### 1.5 病理形态学检查

实验结束时处死动物,用生理盐水及 4% 多聚甲醛,经左心室主动脉灌注固定,取心脏及主动脉根部,常规脱水,石蜡包埋,每只小鼠石蜡连续切片,片厚 5 μm,共 40 张。每间隔 5 张取 1 张,共取 8 张切片做 HE 染色。光镜观察 As 病变的组织学改变,用 CIMAS 多功能真彩色病理图像分析软件做分析各实验组小鼠主动脉根部动脉斑块面积及主动脉根部的管腔面积,计算二者的比值<sup>[5,6]</sup>。

### 1.6 统计学处理

应用 SPSS10.0 软件,多组均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),两组均数之间比较用 *t* 检验,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

### 2.1 何首乌总甙对载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠血脂的影响

由表 1(Table 1)可见,实验结束时,空白对照组与载脂蛋白 E 基因正常小鼠相比,血清 TC 和 TG 有明显升高,HDLC 则明显降低。何首乌总甙高剂量组、低剂量组及阳性药物组血清 TC 和 TG 水平均显著低于空白对照组( $P < 0.01$ );而 HDLC 水平则均显著高于空白对照约 1.8 倍( $P < 0.01$ ),三治疗组间无显著性差异( $P > 0.05$ )。

表 1. 何首乌总甙对载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠血脂的影响(mmol/L)

Table 1. The effect of serum lipids on apolipoprotein E<sup>-/-</sup> mice (mmol/L)

| 分 组    | <i>n</i> | TC                         | TG                        | HDLC                      |
|--------|----------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 空白对照   | 8        | 809.4 ± 42.6               | 253.3 ± 42.6              | 67.3 ± 10.6               |
| 何首乌高剂量 | 8        | 649.3 ± 72.2 <sup>a</sup>  | 126.6 ± 48.1 <sup>a</sup> | 117.1 ± 14.9 <sup>a</sup> |
| 何首乌低剂量 | 8        | 632.6 ± 55.1 <sup>a</sup>  | 145.6 ± 37.9 <sup>a</sup> | 113.5 ± 23.3 <sup>a</sup> |
| 阿托伐他汀  | 8        | 497.4 ± 140.8 <sup>a</sup> | 172.1 ± 15.7 <sup>a</sup> | 126.7 ± 12.8 <sup>a</sup> |

a:  $P < 0.01$ , 与空白对照组比较。

### 2.2 何首乌总甙对载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠主动脉动脉粥样硬化病变形成的影响

空白对照载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>小鼠的肉眼病变最明显,8 只小鼠的主动脉内均可看到较明显的点状或斑片状隆起,白色,略呈淡黄色,微隆起于内膜,突入管腔,边界较清,大小 1~3 mm,多为 1 mm,与内膜结合较稳定,不易脱落。病变处血管壁增厚、变硬,弹性差,易断。治疗组肉眼未看到明显的病变形成,内膜较光滑,血管弹性好,不易断开。

表 2. 不同实验组小鼠主动脉根部斑块面积的比较

Table 2. The atherosclerotic plaque area in the aortic root of different groups

| 分 组    | <i>n</i> | 管腔面积<br>(μm <sup>2</sup> ) | 斑块面积          | 斑块面积/<br>管腔面积            |
|--------|----------|----------------------------|---------------|--------------------------|
| 空白对照   | 8        | 447979 ± 144009            | 82326 ± 34880 | 18.50 ± 6.54             |
| 何首乌高剂量 | 2        | 523869 ± 93440             | 20492 ± 465   | 3.97 ± 0.62 <sup>a</sup> |
| 何首乌低剂量 | 2        | 599321 ± 79746             | 18623 ± 2532  | 3.11 ± 0.01 <sup>a</sup> |
| 阿托伐他汀  | 2        | 615131 ± 35211             | 5180 ± 3718   | 8.61 ± 0.07 <sup>a</sup> |

a:  $P < 0.05$ , 与空白对照组比较。

动脉粥样硬化(As)病变的组织学改变包括以下几种:脂纹、纤维斑块、粥样斑块及复合病变。脂纹病变是 As 的早期病变,大量泡沫细胞聚集即形成脂纹,内皮隆起及变形;纤维斑块的表面有一层纤维帽,是由多量 SMC 及大量细胞外基质(包括胶原、弹性纤维、蛋白聚糖及细胞外脂质)组成。纤维帽下可

见大量富于可溶性及不溶性蜡样脂质的两种泡沫细胞以及细胞外脂质和基质,而当斑块中的细胞成分变少,代之以大量主要由细胞外脂质构成的无定形坏死物质时,说明病变将进展至粥样斑块。复合病变包括斑块内出血、斑块破裂、血栓及动脉瘤形成等。本实验中,可见到 As 病变几个不同发展阶段的病理改变,空白对照组载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠均有斑块形成,其中 4 只形成纤维斑块,4 只形成粥样斑块;较

之空白对照组,三个治疗组则分别仅有 2 只形成了纤维斑块,4 只脂纹形成,2 只管壁未见显著病变(图 1, Figure 1)。

从表 2(Table 2) 及图 2(Figure 2) 可见,与空白对照组相比,何首乌总甙高剂量组、低剂量组及阳性药物组病变程度及其斑块面积占管腔面积均缩小( $P < 0.05$ )。三治疗组间无显著性差异( $P > 0.05$ )。

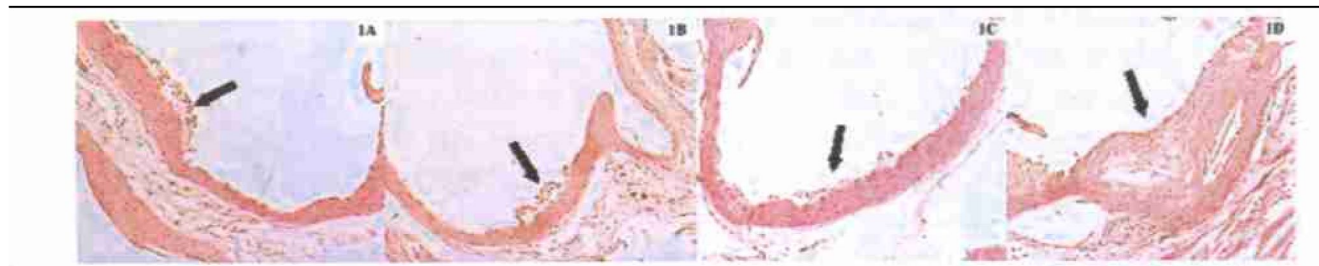


图 1. 载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉根部动脉粥样硬化病变形态学比较(HE × 10) A 为何首乌低剂量组,内皮下较多泡沫细胞灶性浸润,脂纹形成。B 为何首乌高剂量组,内膜灶性隆起于管腔,内皮下灶性泡沫细胞浸润,脂纹形成。C 为阳性药物对照组,管壁局部内皮下少许泡沫样细胞浸润。D 为空白对照组,纤维粥样斑块形成。纤维帽变薄,细胞减少,可见胆固醇结晶。

Figure 1. The comparison of atherosclerotic lesion in aortic root among different groups



图 2. 载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉根部斑块形成的比较(HE × 40) A 为何首乌低剂量组,管壁局部可见灶性纤维斑块形成。B 为何首乌高剂量组,瓣膜根部管壁可见小灶性纤维斑块形成。C 为阳性药物组,管壁内膜可见脂纹形成。D 为空白对照组,管壁内膜大面积纤维-粥样斑块形成,管腔变窄,局部血管外膜大量灶性炎细胞浸润。

Figure 2. The comparison of the atherosclerotic plaque area in the aortic root of different groups

### 3 讨论

动脉粥样硬化性心脑血管疾病是严重危害人类健康的主要疾病,对其发病的基本病理过程已有了较明确的认识,但其发病原因及发病机制尚未彻底阐明。一般认为在诸多确认的危险因子中,血清胆固醇水平增高是惟一不需要其它危险因子协同而足以诱发和推进动脉粥样硬化的发生发展<sup>[7]</sup>,因而,调脂治疗一直是防治 As 的重点。

中药何首乌是蓼科植物何首乌 (polygonum multiflorum Thunb) 的干燥块根,含蒽醌类衍生物、二苯乙烯苷类、磷脂及 Cu、Mn 及 Na 等金属元素。何首乌总甙的主要成分为二苯乙烯苷类。二苯乙烯苷 (2,

3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-β-D-glucoside, 2, 3, 5, 4'-四羟基-二苯乙烯-β-D-葡萄糖苷) 是一种多羟基酚类化合物,2000 年药典将测定二苯乙烯苷类化合物的含量作为何首乌及其制剂的质控标准<sup>[1]</sup>。研究证实,何首乌有抗氧化、抗衰老、抗肿瘤、降脂及抑制细胞凋亡等功效,多是作为调脂药用于防治 As。然而对二苯乙烯苷药理活性的研究较少,因此,研究何首乌总甙的心血管保护作用,对阐明何首乌及其主要成分的中药复方的功效机理有重要意义。

载脂蛋白 E 是一些富含甘油三酯和胆固醇的脂蛋白颗粒表面的成分,又作为配体,促使这些脂蛋白受识别和清除。1992 年,科学家利用基因敲除技术,成功地复制出载脂蛋白 E<sup>-/-</sup> 小鼠<sup>[8]</sup>。载脂蛋白 E<sup>-/-</sup>



小鼠由于其体内清除脂蛋白速度减慢,在正常饮食喂养时即可形成自发性高脂血症,当喂养高脂西式膳食(含0.15%胆固醇,主要来源于牛奶脂肪中的21%脂肪)时,胆固醇水平可以升高到正常饮食喂养的3~4倍。这种高脂血症小鼠的脂纹病变及广泛的纤维斑块损伤,与人类As病变的发生、发展过程及病变部位均十分相似,目前已成为探讨As发生、发展机制及研究干预手段(转基因、细胞移植、饮食及药物等应用)的极佳动物模型。

脂质代谢与动脉粥样硬化的关系近年来一直倍受学者们的关注。脂质的作用主要在于损伤内皮,活化诸如单核细胞、SMC以及中性粒细胞,随后被吞噬形成泡沫细胞,促进As的形成。实验选择8周龄载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠,给予何首乌总甙药物干预10周,18周龄时处死。通过对载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠血脂水平的测定,我们发现,空白对照组载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠血浆TC和TG较载脂蛋白E<sup>+/+</sup>小鼠明显升高,HDLC明显降低;何首乌总甙则可以显著降低血浆TC和TG( $P < 0.01$ ),而明显升高HDLC( $P < 0.01$ ),TC和TG等被视为致As病变的危险因子,HDLC则是As病变的保护性因子,HDLC能促进组织细胞内胆固醇的清除,对抗ox-LDL的毒性作用。因而,HDLC浓度的升高可抑制As病变的形成。研究表明<sup>[9]</sup>胆固醇血症患者用含有何首乌的方剂一定时间后,何首乌合剂治疗组较对照组血清中的TC、TG、LDL和ox-LDL等含量明显降低,提示何首乌总甙是较强的调脂药,它可能通过改善脂代谢而抑制As病变的发生与发展。

研究表明,载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠在5~6周龄时开始出现单核细胞粘附并向受损的内皮细胞迁移,8~10周龄出现脂纹,15~20周龄后逐渐出现纤维斑块、粥样斑块甚至复合病变,病变最严重的部位为主动脉根部,其次为主动脉弓及胸主动脉等血管分支处<sup>[8,10]</sup>。本实验选择8周龄载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠给予何首乌总甙药物干预,然后观察其在18周龄时主动脉根部的病变情况,同空白对照组相比,探讨何首乌总甙能否使As病变在其最活跃也是最关键期-脂纹

期受到遏止,使病变不发展到纤维斑块进而粥样斑块形成。结果发现,8只空白对照组载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠主动脉根部均形成斑块,4只甚至形成了粥样斑块,而用何首乌总甙干预的载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠,高剂量与低剂量组仅有2只形成纤维斑块,大部分As病变仅限于脂纹期,有些病变已经开始消退,表现为管壁的弥漫性增厚甚至恢复了正常形态。以上结果提示何首乌总甙可延缓As病变的形成和减慢病变的发展,早期对As病变进行干预,可以起到预防及减少由As病变引发一系列心脑血管疾病。

总之,本研究结果表明,何首乌总甙可以明显降低载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠的血浆TC和TG水平,升高HDLC水平,通过改善脂质代谢而抑制载脂蛋白E<sup>-/-</sup>小鼠主动脉壁粥样斑块的形成,最终实现阻止动脉粥样硬化的发生、发展。

[致谢] 北京中医药大学中药教研室刘斌博士给予大力支持。

#### [参考文献]

- [1] 叶翠飞,张兰,李斌,艾厚喜,李雅丽,张丽,等. 二苯乙烯苷对胆碱能损伤拟老年性痴呆大鼠学习记忆功能和兴奋性的影响. 中国康复理论与实践, 2003, 9(10): 593-595
- [2] 楚晋,叶翠飞,李林. 二苯乙烯苷对痴呆小鼠学习记忆及自由基代谢的影响. 中国康复理论与实践, 2003, 9(11): 643-645
- [3] 刘治军,李林,叶翠飞,艾厚喜. 二苯乙烯苷对脑缺血小鼠脑组织含水量及自由基代谢的影响. 中国康复理论与实践, 2003, 9(11): 641-642
- [4] 刘治军,李林,叶翠飞,艾厚喜. 二苯乙烯苷对脑缺血啮齿动物脑NMDA受体及细胞内钙离子的影响. 中国药理学报, 2003, 19(10): 1112-1115
- [5] Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D. Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Arteriosclerosis*, 1987, 68: 231-240
- [6] Kitagawa K, Matsumoto M, Sasaki T, Hashimoto H, Kuwabara K, Ohtsuki T, et al. Involvement of ICAM-1 in the progression of atherosclerosis in apoE<sup>-/-</sup> knockout mice. *Atherosclerosis*, 2002, 160: 305-310
- [7] 范乐明. 胆固醇代谢与动脉粥样硬化研究进展. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(1): 41-43
- [8] Breslow JL. Mouse models of Atherosclerosis. *Science*, 1996, 272: 685-688
- [9] 尤忠一,解金兴,卞善述,蒋岳方,刘小林,芮涛,等. 首乌山渣葛根等中药合剂的降脂及降ox-LDL作用. 镇江医学院学报, 2000, 10(2): 234-236
- [10] Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. Apo E-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14(1): 133-140

(此文编辑 胡必利)