

活脉饮对实验性兔动脉粥样硬化病变中胶原及基质金属蛋白酶 1 的影响

李晓东, 刘红霞, 毛颖, 杨智勇

(中国医科大学附属第二医院心内科, 辽宁省沈阳市 110004)

Rabbits

LI Xiao-Dong, LIU Hong-Xia, MAO Ying, and YANG Zhi-Yong

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China)

[KEY WORDS] Huomai Yin; Atherosclerosis; Extracellular Matrix; Collagen; Matrixmetalloproteinase 1; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of Huomai Yin on atherosclerosis. **Methods** The experimental model of atherosclerosis in rabbits was established by endothelial injury by balloon and hyper-lipid feed. The atherosclerosis plaque area, collagen and matrixmetalloproteinase-1 differences between groups were evaluated at the end of the study. **Results** At the end of 8 weeks after endothelial injury by balloon, the plaque area in Huomai Yin highdose group (every day 12 g/kg) was smaller than that in hyper lipid group ($P < 0.01$); compared with simvastatin group, the plaque area in highdose group was larger, but the difference wasn't significant ($P > 0.05$); compared with hyper lipid group, the plaque area in lowdose group (every day 6 g/kg) wasn't significantly smaller ($P > 0.05$). Collagen was reduced in highdose group and lowdose group than in hyper lipid group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Collagen wasn't significantly different between highdose group and simvastatin group ($P > 0.05$), but collagen in lowdose group was more than simvastatin group ($P < 0.05$). The express of matrixmetalloproteinase-1 in highdose group and simvastatin group wasn't significantly different ($P > 0.05$), but was higher than that in hyper lipid group ($P < 0.01$).

Conclusions Huomai Yin has therapeutic effect on atherosclerosis in rabbit. Huomai Yin could modulate the express of matrixmetalloproteinase-1 and decrease collagen accumulation in the atherosclerosis plaque.

近年研究发现胶原不仅是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块组织的支架结构, 而且它对内膜通透性改变、平滑肌细胞迁移和增殖、斑块不稳定等均产生影响, 这其中细胞外基质的主要降解酶——基质金属蛋白酶 (matrixmetalloproteinases, MMP) 的调控发挥了重要作用^[1]。中药活脉饮为补

阳还五汤和血府逐瘀汤的拆方组合, 前期研究证实其具有抑制正常兔血管扩张术后局部附壁血栓形成及减轻新生内膜细胞增殖的作用^[2]。本实验进一步研究活脉饮对 As 病变中胶原及 MMP-1 的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康雄性日本大耳白兔 40 只, 体重 2.3 ± 0.5 kg, 月龄 4~5 个月 (由东北制药厂实验动物部提供), 随机分成空白对照组、单纯高脂组、辛伐他汀治疗组、活脉饮低剂量组和活脉饮高剂量组, 每组 8 只。空白对照组喂普通颗粒饲料, 每只 150 g/天; 单

[收稿日期] 2005-06-29 [修回日期] 2005-12-10

[基金项目] 辽宁省自然科学基金(20042079)

[作者简介] 李晓东, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病及高血压病的临床诊治研究, 联系电话为 024-83956367, E-mail 为 LX D@medmail.com.cn。刘红霞, 硕士研究生, 现在河北省石家庄长城医院工作, 主要从事心肌病及冠心病的研究。毛颖, 硕士研究生。

纯高脂组喂含 8% 胆固醇的高脂饲料 25 g/天+ 普通颗粒饲料 125 g/天; 后 3 组在单纯高脂组喂养的基础上分别给予辛伐他汀(由杭州默沙东制药厂生产) 5 mg/天、按每天 6 g/kg 计算的活脉饮(相当于临床人用剂量 10 倍, 中国医科大学附属第二医院制剂室研制) 以及按每天 12 g/kg 计算的活脉饮, 每周称体重调整活脉饮用量。

1.2 兔动脉粥样硬化模型的制备

参照吴运生等^[3]和李东宝等^[4]方法进行。分组喂养 1 周后, 除空白对照组外其余各组行腹主动脉内皮剥脱术: 按 0.1 mL/kg 846 合剂肌肉注射麻醉, 固定于兔台, 剪去右侧腹股沟区毛发, 无菌条件下切开皮肤及皮下, 游离股动脉约 2 cm 长, 穿线, 远端结扎, 近端阻断血流, 在两线间动脉壁上剪一小口, 插入球囊导管(直径 3.5 mm), 进入深度 15 mm, 压力表充盈球囊压力 8 个大气压至拉回有阻力时, 将球囊导管回拉至髂动脉与股动脉分叉处, 撤压, 间歇 1 min, 然后再次重复操作, 共 3 次。退出球囊导管, 结扎股动脉近心端, 缝合切口。术后肌注青霉素 40 万单位/天, 共 3 天。术后继续分组喂养。内皮剥脱术后第 8 周末, 动物禁食 8 h, 用 846 合剂麻醉, 取髂动脉分叉部以上 2 cm 处腹主动脉 0.5 cm 左右, 用生理盐水冲洗 2 遍, 并用 10% 福尔马林冲洗 2 遍后, 固定备用。

1.3 形态学观察

将固定的腹主动脉标本常规脱水, 石蜡包埋, 切片 3~4 μm。进行 HE 染色, 采用中国医科大学实验设备中心图文分析 Metamorph/C5050/BX41 系统计算内弹力板包绕面积和管腔面积, 并计算内膜增殖比率 = (内弹力板包绕面积 - 管腔面积) / 内弹力板包绕面积。每张切片测 3 次, 求平均值。

1.4 胶原的测定

进行 masson 染色。光镜下观察胶原纤维呈蓝色, 平滑肌细胞呈红色。用计算机图文分析系统进行胶原半定量分析, 计算阳性目标总面积占统计场总面积的百分比。

1.5 基质金属蛋白酶 1 的测定

基质金属蛋白酶 1 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司, 按常规免疫组织化学操作步骤染色, DAB 显色, 切片中棕黄色颗粒为阳性。用计算机图文分析系统, 测定其平均染色光密度值。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 软件, SNK 法单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般情况

实验过程中有 5 只动物死亡, 3 只死于腹泻, 1 只死于术后肢端坏疽感染, 1 只死于术中大出血。实验结束时, 正常对照组余兔 6 只, 单纯高脂组 7 只, 辛伐他汀组 6 只, 活脉饮低剂量组 8 只, 活脉饮高剂量组 8 只。

2.2 病理形态学变化

肉眼观察, 正常对照组内膜表面光滑, 无隆起。单纯高脂组动脉弹性明显下降, 内膜有明显隆起, 管腔狭窄。辛伐他汀组、活脉饮高剂量组和活脉饮低剂量组动脉内膜亦有不同程度的隆起, 但较单纯高脂组轻。光镜观察, 正常对照组动物管腔未见异常改变, 内膜表面光滑, 内皮细胞完整连续; 高脂组内膜明显增厚, 有的甚至环管壁全周, 管腔狭窄, 增厚的内膜中含大量泡沫细胞, 内膜表面不光滑, 内皮细胞缺失或不连续; 辛伐他汀组可见内膜局限性隆起, 内膜下可见少量散在泡沫细胞; 活脉饮低剂量组内膜亦增厚, 但未达管壁全周; 活脉饮高剂量组内膜增厚程度较低剂量组轻, 但其斑块范围较辛伐他汀组大(图 1)。

各实验组与正常对照组比较内膜增殖比率差异均有显著性($P < 0.01$), 活脉饮高剂量组和辛伐他汀组与单纯高脂组相比差异具有显著性($P < 0.01$), 活脉饮高剂量组与辛伐他汀组、活脉饮低剂量组与单纯高脂组差异无显著性(表 1)。

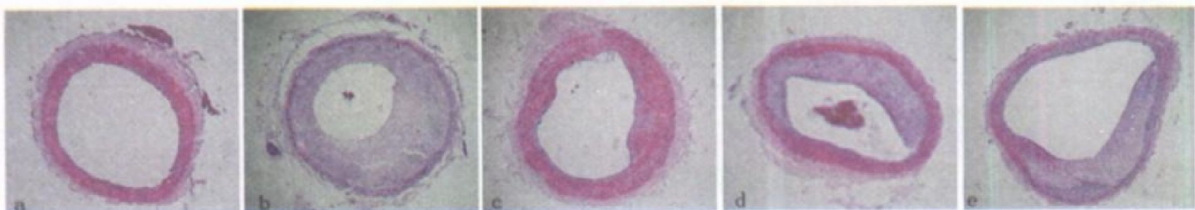


图 1. 各组动物动脉粥样硬化斑块的比较(HE 40 ×) a 为正常对照组, b 为单纯高脂组, c 为辛伐他汀组, d 为活脉饮低剂量组, e 为

活脉饮高剂量组。

表 1. 活脉饮对腹主动脉粥样硬化面积、斑块内胶原及基质金属蛋白酶 1 的影响($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	内膜增殖 比率(%)	面积百分比 (%)	MMP-1 光密度值
正常对照组	6	16.16 ± 2.58	1.92 ± 1.05	0.262 ± 0.008
单纯高脂组	7	57.45 ± 9.84 ^a	44.78 ± 9.35 ^a	0.287 ± 0.010 ^a
辛伐他汀组	6	32.77 ± 16.22 ^b	23.59 ± 8.13 ^b	0.313 ± 0.013 ^b
活脉饮低剂量组	8	48.68 ± 13.19	33.92 ± 5.31 ^c	0.299 ± 0.016
活脉饮高剂量组	8	41.34 ± 9.80	28.56 ± 6.88	0.306 ± 0.011

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较, b 为 $P < 0.01$, c 为 $P < 0.05$, 与单纯高

脂组比较。

2.3 各组胶原含量的比较

masson 染色显示, 正常对照组胶原含量甚微, 内膜几乎未见蓝色染色区域; 高脂组增厚内膜几乎全部染为蓝色, 仅在内膜与中膜交界处可见染色为红色的平滑肌细胞散在其间, 并可见脂质空泡; 活脉饮高剂量组和辛伐他汀组 As 斑块内蓝色染色区域主要位于斑块纤维帽及斑块肩部, 染色范围较高脂组小。活脉饮低剂量组 As 斑块内蓝色胶原纤维与红色平滑肌细胞混杂出现, 并可见脂质空泡(图 2)。

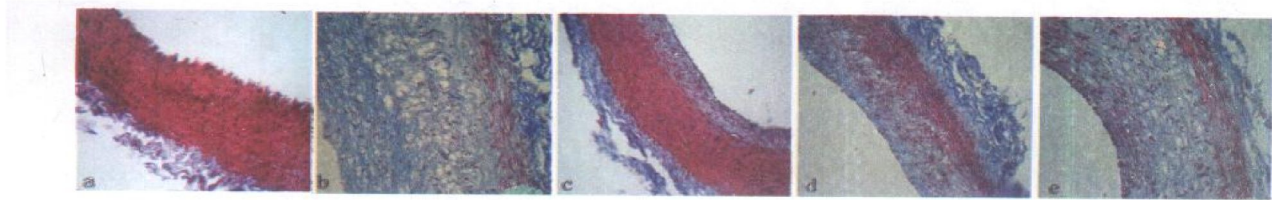


图 2. 各组胶原分布的比较 (masson 染色 400 \times) a 为正常对照组, b 为单纯高脂组, c 为辛伐他汀组, d 为活脉饮低剂量组, e 为活脉饮高剂量组。

对胶原含量进行半定量分析发现, 胶原含量各实验组与正常对照组比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 活脉饮高剂量组和辛伐他汀组较高脂组比较具差异有显著性 ($P < 0.01$), 活脉饮低剂量组与高脂组、辛伐他汀组比较差异有显著性 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.4 各组基质金属蛋白酶 1 表达的比较

免疫组织化学结果发现, MMP-1 为胞浆阳性染

色, 主要分布在内膜与中膜交界处靠近内膜的区域, 在斑块的肩部也有分布, 而在纤维帽处含量较少。各组 MMP-1 的表达见图 3。经计算机图像分析计算显示: MMP-1 的表达在单纯高脂组较正常对照组高 ($P < 0.01$), 活脉饮高剂量组和辛伐他汀组较单纯高脂组高 ($P < 0.01$), 活脉饮低剂量组与单纯高脂组比较差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 1)。



图 3. 各组基质金属蛋白酶 1 表达的比较 a 为正常对照组, b 为单纯高脂组, c 为辛伐他汀组, d 为活脉饮低剂量组, e 为活脉饮高剂量组。

3 讨论

中药复方制剂以其多靶点、多方位的作用特点, 在动脉粥样硬化的防治中具有一定优势, 本试验所用中药活脉饮为补阳还五汤和血府逐瘀汤的拆方组合, 其主要成分为当归、黄芪、川芎、赤芍、红花。前

期研究证实其具有抑制正常兔血管扩张术后局部附壁血栓形成及减轻内膜细胞增生的作用。本实验在通过股动脉内皮剥脱术和高胆固醇喂养的方法成功建立兔动脉粥样硬化模型的基础上, 给予活脉饮治疗用药后, 高剂量组(喂服活脉饮每天 12 g/kg)动脉

粥样硬化斑块的范围较单纯高脂组明显减小,而每天喂服 6 g/kg 活脉饮的低剂量组与单纯高脂组比较无明显差异($P > 0.05$)。辛伐他汀作为调脂药,可通过降脂及改善内皮功能、抗炎等降脂以外的作用延缓动脉粥样硬化的进程^[5]。张园园等^[6]证实辛伐他汀可显著改善兔动脉粥样硬化内皮依赖性血管舒张功能,具有抗动脉粥样硬化的作用。本实验将辛伐他汀作为阳性对照药物比较发现:活脉饮高剂量组动脉粥样硬化斑块范围虽较辛伐他汀组大,但无统计学差异;而低剂量组较辛伐他汀组斑块范围较大。以上说明活脉饮具有抗兔动脉粥样硬化的作用,而且具有一定的剂量依赖性。

研究发现,胶原作为细胞外基质的主要成分,不仅是粥样硬化斑块的支架结构,而且它还在动脉粥样硬化病变进程中发挥重要的作用^[7]。在正常情况下,胶原占血管壁蛋白总量的 20%~30%。现已发现存在于血管壁中的胶原有 13 种。iv、Ⅰ型胶原是血管壁的主要基质胶原,与血管壁的张力和伸延性关系密切;Ⅰ型胶原分布于血管壁平滑肌细胞周围,并且它还是构成内皮细胞基底膜的主要成分,因而又称作基底膜胶原,不仅为细胞提供稳固的物质支持而且还可形成渗透屏障。基质金属蛋白酶是酶活性依赖锌离子的蛋白酶超家族,是细胞外基质降解的主要酶类。目前已发现 25 种人类 MMP,其中 MMP-1 是胶原的主要降解酶之一^[8]。在动脉粥样硬化病变进展过程中,MMP 生成量的变化影响胶原的降解速度,从而对一些关键事件产生重要影响:在动脉粥样硬化病变初期,粘附于内皮细胞的单核细胞和 T 淋巴细胞产生过量的 MMP,促使基底膜的主要组分 Ⅰ型胶原降解,使内皮细胞的通透性增加,导致血浆成分涌入,加速斑块进展;动脉粥样硬化进展期,许多动物实验发现胶原可抑制平滑肌细胞的迁移和增殖^[9],而 MMP 的过表达使胶原降解过多,进而增强动脉受损处平滑肌细胞的迁移和增殖,加速动脉粥样硬化的进程;在成熟的动脉粥样硬化病变中,MMP 表达相对减弱,胶原含量明显增加,使斑块突向管腔,造成动脉狭窄。鉴于以上胶原与 MMP-1 在动脉粥样硬化进程中的重要作用,本试验从该角度对活脉饮的抗动脉粥样硬化的作用机制进行了探讨,结果发现实验兔内皮剥脱术后第 8 周末,MMP-1 的含量在各实验组均较对照组高,在 4 个实验组中,活脉饮高剂量组和辛伐他汀组 MMP-1 含量较高,而单纯高脂组含量较低,与此相反,胶原含量在活脉饮高剂量组和辛伐他汀组较少,而在单纯高脂组则较多。推测活脉饮的抗动脉粥样硬化机制之一可能与

促进粥样硬化斑块内胶原的降解有关。据以往一些文献报道,在单纯动脉粥样硬化动物模型的预防性用药中,模型组 MMP 明显增高,而药物组可抑制增高。而本文是模型组和药物组都升高,用药组增高更为明显,究其原因考虑有以下几种可能:与本试验造模过程中血管内皮剥脱损伤的影响有关,用药后 MMP 进一步升高实际上有利于内皮的修复;④可能与各实验所选取的观察时间点不同有关,有研究表明在血管再狭窄动物模型中 MMP 的表达随时间具有一定的动态演变规律^[10],是否在动脉粥样硬化病变的进程中也存在这样的演变过程,还需要更大样本进行动态观察,才可得出令人信服的结论。

本实验研究发现胶原与 MMP-1 的分布也存在一定规律:胶原在动脉粥样硬化斑块中主要分布于内膜下,形成纤维帽,而在内膜与中膜交界处的斑块深层含量较少,免疫组织化学显示在此区域内 MMP-1 染色阳性,而其在纤维帽处着色较浅;Halpert 等^[11]研究证明斑块中的巨噬细胞可分泌多种 MMP,其中包括 MMP-1。而在粥样斑块深层是巨噬细胞聚集的部位,故推测 MMP-1 在此分布较多与此有一定关系;但是否还存在其他因素,如某些促进 MMP 生成的调节因子等,其确切机制有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Shogo K, Toshiyuki K. Atherosclerosis and extracellular matrix[J]. *J Athero Thromb*, 2003, **10** (5): 267-274
- [2] 李晓东, 宋欣, 谢慧芳. 活脉饮对正常兔血管扩张后血栓形成及内膜增生的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 1999, **15** (4): 352-358
- [3] 吴运生, 张红菱. 实验性动脉再狭窄动物模型的构建与研究[J]. *南通医学院学报*, 2003, **23** (3): 262-265
- [4] 李尔宝, 陈晖, 沈璐华. 兔髂动脉粥样硬化模型的动态实验研究[J]. *上海实验动物科学*, 2000, **20** (4): 213-216
- [5] Masayuke Y. Potential role of statins in inflammation and atherosclerosis[J]. *J Athero Thro*, 2003, **10** (3): 140-144
- [6] 张园园, 张运, 张梅, 高可花, 李秀昌, 李贵华, 等. 舒降之、普罗布考、开搏通和祛淤消斑胶囊对食饵性兔动脉粥样硬化血管内皮舒缩功能的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (2): 118-122
- [7] Guangpei Hou, Diane M, Margaret AG, Michelle PB. Type (I) collagen stimulates smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase synthesis after arterial injury[J]. *Am J Pathol*, 2000, **156** (2): 467
- [8] Nikkari SF, Geary RL, Hatsukami T, Ferguson M, Forough R, Alpers CE, et al. Expression of collagen, interstitial collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in restenosis after carotid endarterectomy[J]. *Am J Pathol*, 1996, **148**: 777-783
- [9] Elaine W. The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease[J]. *Inter J Exp Path*, 2000, **81**: 173-182
- [10] 周秀霞, 温进坤, 韩梅. 血管再狭窄发生过程中 MMP-2 基因表达与胶原转换的动态变化[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 1999, **15** (6): 997-1001
- [11] Halpert I, Sires UI, Roby JD. Matrilysin is expressed by lipid laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (18): 9748-753

(此文编辑 朱雯霞)