

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-09-0778-05

清眩颗粒对高脂饲料喂养大鼠胸主动脉形态及核因子 κ B、血小板源生长因子 B 和碱性成纤维细胞生长因子表达的影响

庄 欣, 孙洪胜, 张世亮

(山东中医药大学附属医院心内科, 山东省济南市 250011)

[关键词] 病理学与病理生理学; 清眩颗粒; 动脉粥样硬化; 大鼠; 胸主动脉病理形态学; 核因子 κ B; 血小板源生长因子 B; 碱性成纤维细胞生长因子

[摘要] 目的 探讨清眩颗粒对大鼠主动脉病理形态学及核因子 κ B、血小板源生长因子 B、碱性成纤维细胞生长因子阳性表达的影响。方法 选取 Wistar 大鼠 50 只, 随机分为空白对照组(对照组)、模型对照组(模型组)、清眩颗粒高剂量组(高剂量组)、清眩颗粒低剂量组(低剂量组)、银杏叶片对照组(银杏叶组), 每组 10 只。除对照组喂食基础饲料外, 其他各组喂食高脂饲料。喂养 8 周后, 分别灌服蒸馏水、高剂量液、低剂量液、银杏叶片液 1 ml/100g, 连续灌胃 4 周。检测大鼠胸主动脉病理形态学斑块大小及核因子 κ B、血小板源生长因子、碱性成纤维细胞生长因子阳性表达。结果 清眩颗粒高、低剂量组和银杏叶片组大鼠胸主动脉粥样硬化病变程度较模型组明显减轻。与模型对照组相比, 清眩颗粒高、低剂量组、银杏叶片对照组粥样斑块面积与管腔面积之比(分别为 21.69 ± 9.86 , 1.96 ± 1.62 , 4.25 ± 3.01 , 5.11 ± 2.82)、胸主动脉壁核因子 κ B(分别为 25.45 ± 4.25 , 10.53 ± 7.09 , 16.67 ± 5.56 , 17.18 ± 6.63 , $P < 0.01$)、血小板源生长因子(分别为 25.18 ± 8.76 , 8.32 ± 5.17 , 12.76 ± 4.38 , 13.32 ± 5.16 , $P < 0.01$)、碱性成纤维细胞生长因子(分别为 9.99 ± 1.63 , 1.41 ± 1.77 , 4.71 ± 3.90 , 5.00 ± 2.47 , $P < 0.01$) 阳性细胞百分比降低, 清眩颗粒高剂量组显著低于银杏叶片对照组($P < 0.05$)。结论 说明清眩颗粒对动脉粥样硬化的作用可能与抑制动脉壁核因子 κ B、血小板源生长因子 B、碱性成纤维细胞生长因子阳性表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Qingxuankeli on Aorta Pathology Morphology and Positive Expression of Nuclear Factor- κ B, Platelet Derived Growth Factor-B, Basic Fibroblast Growth Factor of Rat

ZHUANG Xin, SUN Hong-Sheng, and ZHANG Shi-Liang

(Affiliated hospital of Shandong traditional Chinese medicine university, Jinan 250011 China, China)

[KEY WORDS] Qingxuankeli; Scleratheroma; Rat; aorta pathology morphology; Nuclear Factor κ B; Platelet Derived Growth Factor B; Basic Fibroblast Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** Discuss the effect of Qingxuankeli on rat's aorta pathology morphology and nuclear factor ($\text{NF-}\kappa\text{B}$), platelet derived growth factor (PDGF-B), basic fibroblast growth factor (bFGF) positive expression. **Methods** Choose 50 Wistar rat, assign to normal group (feed basic fodder), model group (feed high fat fodder), high dosage Qingxuankeli group (feed high fat fodder), low dosage Qingxuankeli group (feed high fat fodder), ginkgo blade group (feed high fat fodder).

After the 8 weeks, distilled water, high dosage Qingxuankeli, low dosage Qingxuankeli, liquid of ginkgo blade was irrigated into stomach separately for 4 weeks in succession. Examine rat's aorta pathology morphology and $\text{NF-}\kappa\text{B}$, PDGF-B, bFGF positive expression.

Results The degree of aorta scleratheroma pathological change of high, low dosage Qingxuankeli group, ginkgo blade group is slighter than model group obviously. Compared with the model group, the ratio of plaque area to aortic cavity area (respectively 21.7 ± 9.9 , 1.96 ± 1.62 , 4.25 ± 3.01 , 5.11 ± 2.82), the $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (respectively 25.5 ± 4.2 , 10.53 ± 7.09 , 16.67 ± 5.56 , 17.18 ± 6.63 , $P < 0.01$), PDGF-B (respectively 25.2 ± 8.8 , 8.32 ± 5.17 , 12.76 ± 4.38 , 13.32 ± 5.16 , $P < 0.01$), bFGF (respectively 9.99 ± 1.63 , 1.41 ± 1.77 , 4.71 ± 3.90 , 5.00 ± 2.47 , $P < 0.01$) positive cell's percentage of aorta of the high, low dosage Qingxuankeli group, ginkgo blade group is reduced, the percentage of high dosage Qingxuankeli group is lower than ginkgo blade group ($P < 0.05$).

Conclusion The function of preventing and curing scleratheroma of Qingxuankeli is related to the fact that Qingxuankeli suppress $\text{NF-}\kappa\text{B}$, PDGF-B, and bFGF to express positively.

清眩颗粒是根据中医温肾益气、化瘀通络法拟定的处方。前期动物实验与临床研究均证实本方具

有降低血脂, 保护内皮功能, 升高一氧化氮, 降低内皮素和血管紧张素 Ang II 的功效^[1,2]。银杏叶片是当今市场上防治动脉粥样硬化疗效最确切的中成药, 它具有缩小斑块面积, 保护内皮功能, 降低内皮素和总胆固醇含量, 升高一氧化氮和高密度脂蛋白水平等

[收稿日期] 2005-07-13

[修回日期] 2006-08-21

[作者简介] 庄欣, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病基础与临床, 联系电话 0531-82592135, E-mail 为 zhuangxin1972@126.com。

作用^[3-5]。为了进一步探讨清眩颗粒对动脉粥样硬化的治疗作用,本研究选用银杏叶片作为对照药物,采用核因子 κ B、血小板源生长因子 B (platelet-derived growth factor-B, PDGF-B) 和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF) 作为指标,观察高脂饲料喂养大鼠胸主动脉形态和这三种因子表达,旨在探讨清眩颗粒对 As 的防治作用。

1 材料和方法

1.1 实验药品

清眩颗粒由黄芪、肉桂、川芎、海风藤、沙苑子、三七粉等组成。成人量为 6 g/次,日 3 次。大鼠清眩颗粒低剂量设为成人量的 1 倍,约 1.6 g/kg;高剂量设为成人量的 2 倍,约 3.2 g/kg,临用前加蒸馏水分别稀释成 0.16 g/mL(清眩颗粒低剂量)和 0.32 g/mL(清眩颗粒高剂量)的药液,4℃冰箱保存。银杏叶片 12 mg/片,深圳海王药业有限公司生产,主要成分银杏总黄酮,每片含 9.6 mg,批号 20040224。将银杏叶片用蒸馏水稀释成银杏叶片液,浓度 2.58 mg/mL,4℃冰箱保存。

1.2 动物分组、模型制备及给药方法

选取 Wistar 大鼠 50 只,重量 180~200 g,雌雄兼半,由山东省实验动物中心提供。随机分为空白对照组(对照组)、模型对照组(模型组)、清眩颗粒高剂量组(高剂量组)、清眩颗粒低剂量组(低剂量组)、银杏叶片对照组(银杏叶组),每组 10 只。除对照组喂食基础饲料外,其他各组喂食高脂饲料。高脂饲料由 3%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧嘧啶、5%白糖、10%猪油和 81.3%基础饲料配制而成。在喂食开始时一次性腹腔注射维生素 D 60 万 IU/kg。喂养 8 周后,对照组、模型组、高剂量组、低剂量组和银杏叶组按体重分别用蒸馏水、清眩颗粒高剂量液、清眩颗粒低剂量液和银杏叶片液 10 mL/kg 灌胃,每天 1 次,连续灌胃 4 周。

1.3 取材及处理

于实验第 13 周将大鼠用 20%乌拉坦腹腔麻醉(1 g/kg),快速开胸,取胸主动脉段 2 cm,经 10%福尔马林溶液 48 h 充分固定,常规脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。

1.4 形态学观察及斑块大小评价

每一蜡块(组织块)连续 4 μ m 切片,每间隔 8 张取一张,共取 6 张,分别行 HE 染色。光镜下观察大鼠胸主动脉血管形态学改变。用 CIMAS 多功能真彩色病理图像分析仪测量血管管腔面积和粥样斑块

面积,计算斑块面积与管腔面积百分比。

1.5 免疫组织化学

每一蜡块(组织块)连续 4 μ m 切片,每间隔 8 张取一张,共取 6 张,分别行核因子 κ B、bFGF 和 PDGF-B 免疫组织化学染色。石蜡切片脱蜡之水化,免疫组织化学采用 SABC 法,切片经微波热抗原修复,3%双氧水、血清封闭,加一抗,4℃冰箱过夜。染色过程分别设阳性对照和阴性对照组,阴性对照以 PBS 缓冲液替代一抗。阳性对照以已知切片作对照 DBA 显色。试剂均购自武汉博士德生物公司。

核因子 κ B 阳性细胞的表达:胞核以及靠近核膜的部分胞浆染色呈棕黄色,可见棕黄色颗粒沉积。PDGF-B 阳性细胞表达:以胞质内出现棕黄色颗粒状沉淀物为阳性细胞,动脉病变周围为主。bFGF 阳性细胞表达:阳性细胞胞浆染色成均一的棕黄色或黄色,在高倍视野下观察呈颗粒状,尤以胞膜内面最为显著,细胞核几乎不着色。

每张切片在物镜为 20 倍的光镜下选择阳性细胞较多的区域采集 3~5 个视野,输入 HBZAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统内,在相同的背底倍体条件下,选择阳性细胞占有细胞的百分比含量均值,或阳性细胞灰度均值,进行计算机定量分析。上述结果均作 *t* 检验。

2 结果

2.1 组织形态学观察

光学显微镜下可见对照组大鼠动脉内膜完整光滑,中膜 SMC 排列均匀,弹力膜完整,未见突起、卷曲及断裂,未见病理改变。模型组大鼠动脉内膜部分内皮细胞脱落消失,部分内膜向腔内突起,中膜见较多大小不等的裂隙,及较多的空泡细胞和较大的钙化灶(As 钙化形成)。有的动脉血管中膜空洞缺损,缺损周围呈虫蛀样。外膜可见堆积成团的泡沫细胞,有少量泡沫细胞侵入外膜达中膜。高剂量组大鼠多数内膜完整、光滑,内皮细胞未见明显病理改变,仅在中膜见有小的裂隙及少量空泡细胞。低剂量与银杏叶组大鼠除各一例出现 As 钙化灶外,其余均好于模型组,但差于高剂量组(图 1)。

2.2 斑块大小评价

如表 1 所示,高剂量组、低剂量组和银杏叶组斑块面积与管腔面积之比较模型组明显降低($P < 0.01$),高剂量组斑块面积与管腔面积之比低于银杏叶组($P < 0.05$)。说明清眩颗粒与银杏叶片均能减少 As 斑块面积,大剂量清眩颗粒疗效优于银杏叶片。

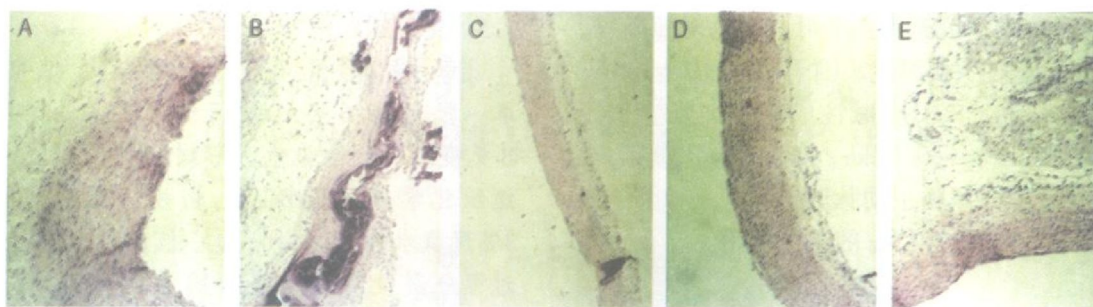


图 1. 光学显微镜下大鼠胸主动脉形态学变化(HE 染色, 100 \times) A 为对照组, B 为模型组, C 为银杏叶组, D 为清眩颗粒低剂量组, E 为清眩颗粒高剂量组。

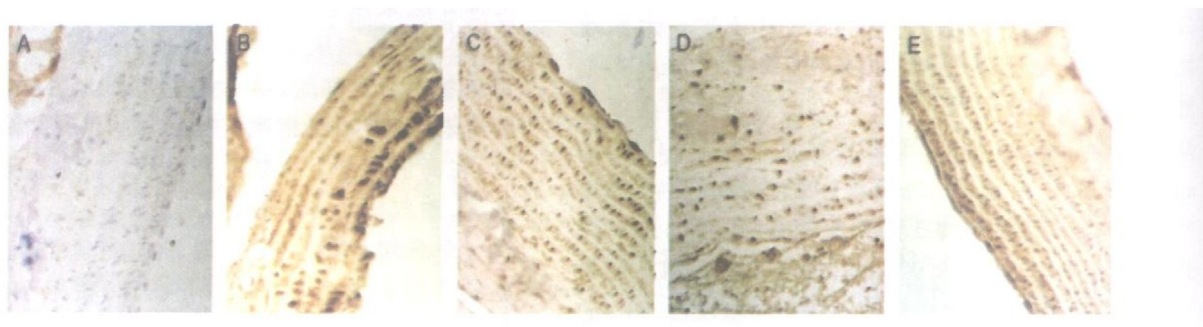


图 2. 大鼠胸主动脉核因子 κ B 阳性细胞(DAB 显色, 400 \times) A 为对照组, B 为模型组, C 为银杏叶组, D 为清眩颗粒低剂量组, E 为清眩颗粒高剂量组。

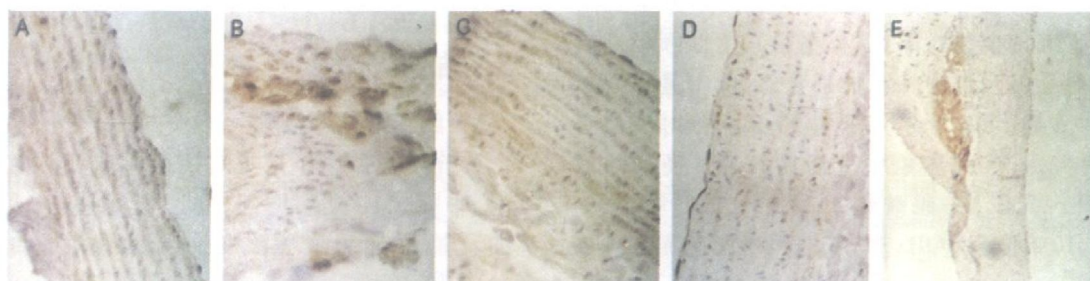


图 3. 大鼠胸主动脉碱性成纤维细胞生长因子阳性细胞(DAB 显色, 400 \times) A 为对照组, B 为模型组, C 为银杏叶组, D 为清眩颗粒低剂量组, E 为清眩颗粒高剂量组。

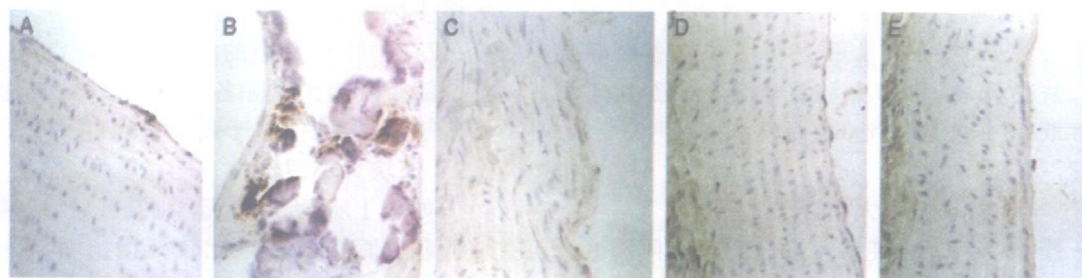


图 4. 大鼠胸主动脉血小板源生长因子 B 阳性细胞(DAB 显色, 400 \times) A 为对照组, B 为模型组, C 为银杏叶组, D 为清眩颗粒低剂量组, E 为清眩颗粒高剂量组。

2.3 大鼠胸主动脉免疫组织化学检测结果

大鼠胸主动脉免疫组织化学检测结果如图 2 (核因子 κB)、图 3(bFGF)、图 4(PDGF) 和表 2 所示。可见高剂量组、低剂量组、银杏叶组和模型组的胸主动脉核因子 κB 、bFGF 和 PDGF 阳性细胞百分比均高于对照组 ($P < 0.01$)。高剂量组、低剂量组和银杏叶组与模型组相比有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。高剂量组低于银杏叶组 ($P < 0.05$)。提示高剂量清眩颗粒抑制这三种因子表达的疗效优于银杏叶片。

表 2. 三种因子阳性细胞百分比 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	例数	核因子 κB	bFGF	PDGF
对照组	10	3.47% \pm 1.28%	0.36% \pm 0.25%	2.89% \pm 1.06%
模型组	8	25.45% \pm 4.25% ^b	9.99% \pm 1.63% ^b	25.18% \pm 8.76% ^b
银杏叶组	9	17.18% \pm 6.63% ^{bd}	5.00% \pm 2.47% ^{bd}	13.32% \pm 5.16% ^{bd}
低剂量组	10	16.67% \pm 5.56% ^{bd}	4.71% \pm 3.90% ^{bd}	12.76% \pm 4.38% ^{bd}
高剂量组	10	10.53% \pm 7.09% ^{ade}	1.41% \pm 1.77% ^{ade}	8.32% \pm 5.17% ^{ade}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; e 为 $P < 0.05$, 与银杏叶组比较。

3 讨论

动脉粥样硬化(As)是严重危害公众健康的常见病和多发病,近年来在我国呈增长趋势。核因子 κB 是调节基因转录的关键因子,受其调控的基因表达产物囊括了大多数参与 As 发病的主要细胞因子,如生长因子、粘附分子和趋化因子等,在 As 的发生和发展中起着重要作用^[20,21],因此,如何抑制核因子 κB 的活化日益受到重视。PDGF 是一种重要的促细胞分裂剂,可以刺激多种细胞如血管 SMC、内皮细胞等的分裂和增殖,通过多种途径加速 As 的进程。bFGF 对中胚层来源的细胞有强烈的促增殖和分化作用,能够促进血管内皮细胞再生、SMC 增殖和迁移、胶原合成增加,从而加速 As 的发展。同时,PDGF-B 为诱导效应最强的生长因子之一,它与 bFGF 作为刺激物均可直接促进核因子 κB 表达及活性增强^[9-11],因此,抑制 PDGF 和 bFGF 的表达能够抑制 As 的进展。

根据 As 多见于中老年人,具有经久难愈,入络入血等临床特点,属于中医学络病范畴,据此拟定了温肾益气、化瘀通络的治疗大法,研制而成清眩颗粒。本研究通过检测大鼠胸主动脉壁核因子 κB 、PDGF-B 和 bFGF 发现,清眩颗粒高、低剂量组与银杏叶组均能抑制胸主动脉壁核因子 κB 、PDGF-B 和 bFGF 阳性表达。清眩颗粒高剂量组疗效优于银杏叶组 ($P < 0.05$)。胸主动脉组织形态学观察及斑块

表 1. 大鼠胸主动脉粥样斑块面积与管腔面积比 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	斑块面积与管腔面积比
对照组	10	
模型组	8	21.7% \pm 9.9%
银杏叶组	9	5.11% \pm 2.8% ^d
低剂量组	10	4.25% \pm 3.0% ^d
高剂量组	10	1.96% \pm 1.6% ^{de}

c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; e 为 $P < 0.05$, 与银杏叶组比较。

大小评价发现,清眩颗粒高剂量组胸 As 病变程度较清眩颗粒低剂量组、银杏叶组、模型组明显减轻,清眩颗粒低剂量组、银杏叶组 As 病变程度轻于模型组。本实验证实,清眩颗粒及银杏叶片均具有防治 As 的作用,高剂量清眩颗粒疗效优于银杏叶片。其作用机制可能与清眩颗粒及银杏叶片均能抑制动脉壁核因子 κB 、PDGF-B 和 bFGF 阳性表达,高剂量清眩颗粒疗效优于银杏叶片有关。同时,清眩颗粒及银杏叶片对 PDGF-B 和 bFGF 阳性表达的抑制,与该药抑制核因子 κB 的表达有一定关系。反之,其抑制 PDGF 和 bFGF 阳性表达,在一定程度上亦有助于抑制核因子 κB 的表达。从而为清眩颗粒治疗 As 提供了理论依据和实验基础。

[参考文献]

- [1] 孙洪胜, 庄欣. 清眩颗粒对动脉粥样硬化大鼠 NO, ET, AT 表达的影响[J]. 中药药理与临床杂志, 2006, 12 (4): 361-362
- [2] 高书荣, 李文彦, 沈均, 陆文强, 王纯杰. 银杏叶片治疗老年颈动脉粥样硬化斑块的临床观察[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26 (3): 323-324
- [3] 陈静, 许喜泳, 刘淑华. 银杏叶片对冠心病心绞痛患者血浆内皮素与一氧化氮的影响[J]. 数理医药学杂志, 2002, 15 (6): 517-518
- [4] 陈正荣. 银杏叶片对血脂、血小板功能的影响观察[J]. 江苏中医药, 2002, 20 (1): 74
- [5] Ferns GA, Avades TY. The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models [J]. Int J Exp Pathol, 2000, 81 (2): 63-88
- [6] Ohba M, Shibanumola M, Kuroki M, et al. Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor- β 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells [J]. Cell Biol, 1994, 126: 1 079-088
- [7] obata H, Biro S, Arima N, et al. NF- κB is in the nuclei of cultured rat aortic

- smooth muscle cells by stimulation of various growth factors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 224
- [8] Marumot T, Schioni-Kentth VB, Fiaslthaler B, et al. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF- κ B and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 1997, 96: 2 361-367
- [9] 任新瑜, 阮秋蓉, 朱大和, 朱敏瞿, 智玲, 路军. 川芎嗪对平滑肌细胞 NF- κ B 激活, 骨形成蛋白-2 表达的影响[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2003, 12 (3): 303-310
- [10] 李大强, 冯义柏, 张会琴, 白智峰. 雷米普利和氯沙坦对高胆固醇血症大鼠早期动脉粥样硬化形成的影响[J]. *临床心血管病杂志*, 2003, 19 (5): 280-282
- [11] 杨爱东, 郭永洁, 余星, 吴中华, 黄琦, 方军. 益气活血通脉颗粒对动脉粥样硬化模型家兔 NO, ET, bFGF 的影响[J]. *上海中医药大学学报*, 2003, 17 (1): 51-53
- [12] 欧阳静萍, 王保华, 刘永明, 杨静薇, 魏蕾, 李柯. 阿魏酸钠对高脂血症家兔动脉粥样硬化形成的影响及其机制的研究[J]. *中国药理学通报*, 2002, 18 (2): 207-210
- [13] 周俊琴, 焦玲霞, 温瑞书. 芪丹煎对动脉粥样硬化家兔胸主动脉 PDGF-B 表达和心肌 CAMP 的影响[J]. *中华实用中西医杂志*, 2004, 4 (17): 781-782
- [14] 张红霞, 李广斌, 姜希娟, 范英昌. 调肝导浊中药对动脉粥样硬化家兔 PDGF-A 及其受体 A 表达的影响[J]. *天津中医药*, 2003, 20 (5): 61-63
- [15] 杨鹏远, 芮耀诚, 焦亚斌. 动脉粥样硬化大鼠模型的建立[J]. *第二军医大学学报*, 2003, 24 (7): 802-804
- [16] Stephen E, Epstein MD, Zhou YF, et al. Current perspective infection and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 1999, 100: 202-228
- [17] 崔华, 何作云. 不同阶段食饵性动脉粥样硬化兔血管壁核因子 JB 活化和单核细胞趋化蛋白 1 与蛋白激酶 CA 表达的变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10 (4): 312-315
- (此文编辑 胡必利)

•读者•作者•编者•

我刊报道的疾病和诊治方法

- 1 肥胖症
- 2 小儿肥胖病
- 3 原发性高脂蛋白血症
- 4 高脂血症
 - 4.1 高胆固醇血症
 - 4.2 高甘油三酯血症
 - 4.3 混合型高脂血症
- 5 原发性肺动脉高压症
- 6 早老症
 - 6.1 弥漫性动脉粥样硬化
 - 6.2 冠状动脉栓塞
- 7 冠状动脉粥样硬化性心脏病
 - 7.1 原发性心跳骤停
 - 7.2 心绞痛
 - 7.3 心肌梗死
 - 7.4 冠状动脉性心力衰竭
 - 7.5 缺血性心律失常
- 8 急性冠状动脉综合征
- 9 动脉硬化症
 - 9.1 颈动脉硬化症
 - 9.2 肾动脉硬化
 - 9.3 动脉硬化性主动脉瘤
 - 9.4 动脉硬化性闭塞症
 - 9.5 动脉硬化性周围动脉缺血
- 10 高血压病
- 11 周围血管疾病
 - 11.1 血栓闭塞性脉管炎
 - 11.2 雷诺综合征
 - 11.3 手足紫绀症
 - 11.4 急性动脉栓塞
 - 11.5 肢端动脉痉挛病
- 12 伯格氏病
- 13 短暂性脑缺血发作
 - 13.1 黑矇
 - 13.2 视野异常
- 14 脑梗死
 - 14.1 脑血栓形成
 - 14.2 脑血管栓塞
 - 14.3 腔隙性脑梗死
 - 14.4 多发梗死性痴呆
- 15 脑动脉硬化症
- 16 动脉硬化性精神病
- 17 其他缺血性脑血管疾病
- 18 粥样栓塞性肾病
- 19 肾动脉血栓形成或栓塞
- 20 糖尿病合并心血管疾病
 - 20.1 糖尿病并发冠心病
 - 20.2 糖尿病性心肌梗死
 - 20.3 糖尿病并发血管病变
- 21 代谢综合征
- 22 血管疾病的影像学诊断
- 23 血管疾病的手术疗法
 - 23.1 动脉旁路移植术
 - 23.2 动脉内膜切除术
 - 23.3 激光心肌内血管重建术
 - 23.4 经皮腔内血管成形术
 - 23.5 其它血管手术
- 24 血管疾病的基因疗法

(胡必利编写)