

[文章编号] 1007-3949(2007)15-02-0101-04

• 实验研究 •

复方丹参滴丸对动脉粥样硬化粘附因子的作用

陈良, 张梅, 李长江, 姚桂华, 李晓楠, 徐新生, 萧亚伟, 蒋桂花, 张运

(教育部和卫生部心血管重构和功能研究重点实验室 山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012)

[关键词] 内科学; 复方丹参滴丸; 动脉粥样硬化; 粘附因子; 血清脂质; 高敏 C 反应蛋白

[摘要] 目的 观察复方丹参滴丸对动脉粥样硬化粘附因子的作用。方法 30 只雄性新西兰大白兔应用球囊拉伤腹主动脉后, 高脂饲养 12 周, 然后随机分为安慰剂组、小剂量复方丹参滴丸组和大剂量复方丹参滴丸组, 分别给予安慰剂、复方丹参滴丸 5 粒/天和复方丹参滴丸 10 粒/天治疗, 12 周后处死实验兔, 留取腹主动脉标本进行病理检测; 实验前后耳缘静脉抽血检测总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和高敏 C 反应蛋白水平; 应用高频超声检测腹主动脉; 免疫组织化学染色检测血管细胞粘附因子 1 和细胞间粘附因子 1 以及巨噬细胞的分布, 逆转录聚合酶链反应检测血管细胞粘附因子 1 和细胞间粘附因子 1 mRNA 的表达。结果 与安慰剂组比较, 复方丹参滴丸治疗组可以降低总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平 ($P < 0.05$), 升高高密度脂蛋白胆固醇水平 ($P < 0.05$); 高敏 C 反应蛋白有降低趋势; 血管细胞粘附因子 1、细胞间粘附因子 1 和巨噬细胞均减少, 血管细胞粘附因子 1 和细胞间粘附因子 1 mRNA 的表达降低 ($P < 0.01$); 内膜中膜厚度降低 ($P < 0.05$)。结论 复方丹参滴丸可以抑制粘附因子的表达, 从而抑制动脉粥样硬化炎症反应, 延缓动脉粥样硬化进展。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Radix Salviae Miltiorrhizae Cardiotonic Pills on Adhesion Factors in Atherosclerotic Rabbits

CHEN Liang, ZHANG Mei, LI Chang-Jiang, YAO Gui-Hua, LI Xiao-Nan, XU Xin-Sheng, XIAO Ya-Wei, and JIANG Gui-Hua
(Key Laboratory of Cardiovascular Remodeling and Function Research; Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012; China)

[KEY WORDS] Radix Salviae Miltiorrhizae Cardiotonic Pills; Atherosclerosis; Adhesion Factor; Serum Lipids; High Sensitive C Reaction Protein

[ABSTRACT] Aim To estimate the effect of Radix Salviae Miltiorrhizae Cardiotonic Pills (RSMCP) on adhesion factors.

Methods 30 male New Zealand rabbits were fed with a diet of 1% cholesterol for 12 weeks after they were underwent balloon-induced abdominal aortic wall injury. At the end of the 12th week, they were randomly divided into 3 groups. 3 groups were separately given lower-dose RSMCP (5 pills/d), higher dose RSMCP (10 pills/d) for 12 weeks, the last group was control group. At the beginning of the experiment, 12th week, and 24th week, blood samples were collected to measure the lipid profile, concentrations of high sensitive C reaction protein (hs-CRP); abdominal aorta was measured by high frequency ultrasound.

The abdominal aorta were processed and examined by HE stain, immunohistochemical stain for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and macrophage, and light reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for mRNA of ICAM-1 and VCAM-1.

Results Compared with control group, the RSMCP treatment could decrease low density lipoprotein cholesterol (LDLC), total cholesterol (TC) and hs-CRP, increase high density lipoprotein cholesterol (HDL), and decrease intima-media thickness (IMT) ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); VCAM-1, ICAM-1 and their mRNA, macrophage were decreased in all the treatment group.

Conclusions RSMCP can inhibit the expression of adhesion factors, so inhibit inflammation on atherosclerosis, and postpone atherosclerotic progress in rabbits.

粘附因子在动脉粥样硬化发生发展中起着重要作用^[1-3]。中药复方丹参滴丸在体外实验中显示有良好的调脂和抗氧化应激作用^[4], 但对动脉粥样硬化粘附因子的报道较少。本实验建立新西兰大白兔动脉粥样硬化模型, 然后给予复方丹参滴丸治疗, 观察复方丹参滴丸对粘附因子的作用。

[收稿日期] 2006-11-09

[修回日期] 2007-02-01

[作者简介] 陈良, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的基础和临床, E-mail 为 chocy362@sina.com。通讯作者张梅, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的基础和临床。李长江, 博士研究生。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性纯种新西兰大白兔 30 只, 体重 1.72 ± 0.12 kg, 由山东省农业科学院提供。胆固醇(河南平顶山市东珠生物制品有限公司, 批号 20050219), 复方丹参滴丸(天津天士力公司, 批号 20050108)。

1.2 动脉粥样硬化兔模型的建立及分组

参照文献[5, 6]行腹主动脉球囊损伤术。应用 30 mg/kg 戊巴比妥钠经兔耳缘静脉注射麻醉后, 分

离右侧股动脉,直视穿刺鞘管后,沿导丝将球囊导管送入腹主动脉,充盈球囊,然后回拉球囊导管至髂总动脉,反复回拉3次损伤腹主动脉内皮。退出球囊导管后结扎股动脉,抗生素预防感染。

30只雄性纯种新西兰大白兔球囊拉伤腹主动脉后,应用1%高胆固醇饲料喂养12周。12周末,随机分为三组:小剂量复方丹参滴丸组给予复方丹参滴丸5粒/天,大剂量丹参滴丸组给予复方丹参滴丸10粒/天,安慰剂组给予安慰剂,各组通过灌胃给药。12周末各组同时改用普通饲料喂养12周。

1.3 腹主动脉高频超声检测

分别于实验前、12周末、24周末做三次腹主动脉体表超声检查。应用荷兰飞利浦公司HP Sonos 7500型超声显像仪测量腹主动脉舒张末期内径(Dd)、收缩末期内径(Ds)、内中膜厚度(intima-media thickness, IMT)和收缩期峰值速度(Vp)。调整仪器进入AD-IBS状态,调整感兴趣区形状、方向和大小,分别置于腹主动脉内中膜和外膜,连续2.48s测量,每个部位共获取62帧图像。计算平均回声强度(average image intensity, AII)。为了消除测量时所受仪器和腹壁条件的影响,将内中膜平均回声强度(AII-I)与外膜平均回声强度(AII-A)的比值AIIc%作为内中膜校正的AD值。

1.4 血液指标的测定

分别于实验前、12周末和24周末作血液生物化学检测。禁食12h以上,测量体重后,经耳缘静脉抽取空腹血,留自凝血清检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平,计算低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。应用ELISA法(试剂盒购自美国BPB公司)测定血清高敏C反应蛋白(high sensitive-C reaction protein, hs-CRP)水平。

1.5 病理学检查

24周末,过量麻醉处死实验兔。截取髂动脉分叉上2~3cm腹主动脉血管段,常规固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,浸蜡,常规石蜡包埋,切片厚度5 μ m,苏木素-依红(HE)染色,中性树胶封片。

石蜡切片脱蜡至水并水化,3% H_2O_2 10 min阻断内源性过氧化物酶,蒸馏水洗3遍,浸入枸橼酸缓冲液,微波加热至92℃~98℃,PBS洗3遍。5%正常山羊血清封闭,室温温育20 min后,弃血清,分别滴加1:100的细胞间粘附分子1(intercellular adhesion molecule, ICAM-1)抗体(美国Santa Cruz公司)、1:100的血管细胞粘附分子1(vascular cell adhesion mole-

cule, VCAM-1)抗体(美国Santa Cruz公司)和1:400 RAM11抗体(美国Lab Vision公司),4℃冰箱过夜,PBS洗3遍,滴加浓度为1:100 HRP标记的二抗,室温温育1 h, PBS洗3遍。滴加DAB显色,镜下控制显色时间,苏木素复染,盐酸酒精分化,然后脱水、透明、中性甘油明胶封片。

1.6 荧光实时逆转录聚合酶链反应检测腹主动脉细胞间粘附分子1和血管细胞粘附分子1的表达

冰上称取50 mg血管组织,剪碎后加入1 mL Triol(美国Invitrogen公司),按照说明书提取mRNA。根据逆转录试剂盒M-MLV逆转录酶体系(美国Promega公司)的要求将2 μ L总mRNA逆转录成cDNA。从NCBI基因文库中查找相关的mRNA序列并设计出各个基因的引物,由上海Introvigen公司合成引物序列。ICAM-1上下游引物分别为5'-TGC TCC GCC TTC CAC CAG-3'和5'-TGG CAC CAC GCA GTC CTC-3',产物大小为136 bp, VCAM-1的上下游引物分别为5'-AGT CCC TCG TCC ATC GTG-3'和5'-GA A AGA GGC TGT AGG TCC-3',产物大小为122 bp,内参照 β -actin的上下游引物分别为5'-AGG CAC CAG GGC GTG AT-3'和5'-CTC TTG CTC TGG GCC TCGT-3',产物大小为71 bp。反应条件为95℃预变性0 s,变温速率20℃/s,40个扩增循环,每循环95℃变性0 s,55℃复性5 s(β -actin采用59℃复性),72℃延伸10 s,变温速率20℃/s;解链曲线分析1个循环,95℃变性0 s,65℃延伸30 s,95℃分析0 s,变温速率0.1℃/s;40℃冷却30 s,变温速率20℃/s。所有数据均由分析系统自动采集并分析。

1.7 统计学方法

应用SPSS13.0统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前后用配对 t 检验,三组比较采用方差分析。显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 动物存活状况

30只新西兰大白兔经过球囊拉伤以及高脂饮食12周后,有5只动物意外死亡。25只兔进入实验,小剂量复方丹参滴丸组9只,大剂量复方丹参滴丸组8只,安慰剂组8只。

2.2 血液指标的变化

与安慰剂组比较,大剂量和小剂量复方丹参滴丸组均可以降低LDLC和TC水平($P < 0.05$),大剂量复方丹参滴丸组同时升高HDLC水平($P < 0.05$);大剂量和小剂量复方丹参滴丸组hsC-RP都有降低

的趋势,但差异无统计学意义(表 1)。

表 1. 血液指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	HDLc (mmol/L)	hs-CRP ($\mu\text{g/L}$)
造模前	30	1.30 \pm 0.24	1.13 \pm 0.46	0.53 \pm 0.16	0.68 \pm 0.14	116.6 \pm 18.1
造模后	25	20.8 \pm 2.7 ^b	2.72 \pm 0.42 ^b	20.2 \pm 3.5 ^b	0.94 \pm 0.36 ^b	168.7 \pm 20.8 ^b
安慰剂组	8	13.3 \pm 6.8	0.92 \pm 0.32	8.41 \pm 0.92	0.42 \pm 0.12	151.2 \pm 9.8
小剂量复方丹参滴丸组	9	8.54 \pm 2.29 ^a	0.79 \pm 0.62	6.75 \pm 1.73 ^a	0.45 \pm 0.06	135.3 \pm 12.7
大剂量复方丹参滴丸组	8	5.29 \pm 1.53 ^a	0.65 \pm 0.15	3.27 \pm 0.66 ^a	0.59 \pm 0.17 ^a	131.4 \pm 13.5

a 为 $P < 0.05$, 与安慰剂组比较; b 为 $P < 0.01$, 与造模前比较。

2.3 超声检查结果

造模后超声检查各个参数均比造模前增加(P

< 0.01); 与安慰剂组比较, 大剂量和小剂量复方丹参滴丸组 IMT 降低, AIIc% 升高($P < 0.05$; 表 2)。

表 2. 各组实验兔腹主动脉超声检查结果 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	IMT (mm)	Dd (mm)	Ds (mm)	AIIc%	Vp (mm/s)
造模前	30	0.32 \pm 0.06	3.00 \pm 0.22	2.89 \pm 0.26	0.78% \pm 0.05%	80.9 \pm 9.6
造模后	25	0.97 \pm 0.11 ^b	4.48 \pm 0.92 ^b	4.30 \pm 0.28 ^b	0.63% \pm 0.06% ^b	125.6 \pm 28.9 ^b
安慰剂组	8	0.87 \pm 0.01	5.19 \pm 0.58	4.66 \pm 0.15	0.57% \pm 0.06%	108.9 \pm 7.2
小剂量复方丹参滴丸组	9	0.67 \pm 0.05 ^a	5.25 \pm 0.79	4.69 \pm 0.17	0.64% \pm 0.06% ^a	130.1 \pm 23.7 ^a
大剂量复方丹参滴丸组	8	0.62 \pm 0.11 ^a	4.00 \pm 0.57	4.29 \pm 0.44	0.69% \pm 0.06% ^a	123.4 \pm 33.2

a 为 $P < 0.05$, 与安慰剂组比较; b 为 $P < 0.01$, 与造模前比较。

2.4 病理学改变

HE 染色发现, 安慰剂组斑块较大, 纤维帽比较薄; 复方丹参滴丸组斑块较小, 纤维帽较厚(图 1)。免疫组织化学染色发现, 安慰剂组着色较深, 斑块内巨噬细胞和粘附分子表达较多; 而复方丹参滴丸组着色较浅, 斑块内部巨噬细胞较少, 粘附因子表达降低(图 2 和 3)。

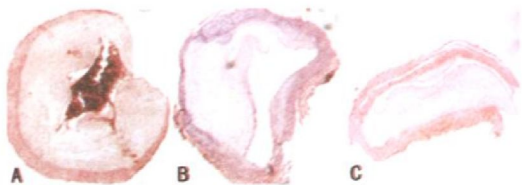


图 1. HE 染色图 ($\times 40$) A 为安慰剂组, B 为小剂量复方丹参滴丸组, C 为大剂量复方丹参滴丸组。

2.5 血管细胞粘附分子 1 和细胞间粘附分子 1 mRNA 的表达

大剂量复方丹参滴丸组和小剂量复方丹参滴丸组 ICAM-1 mRNA 的表达均比安慰剂组降低(2.29 ± 0.55 和 2.82 ± 1.32 比 10.91 ± 2.96 , $P < 0.01$); 而大

剂量复方丹参滴丸组和小剂量复方丹参滴丸组 VCAM-1 mRNA 的表达也比安慰剂组降低(1.36 ± 0.80 和 1.71 ± 0.32 比 3.25 ± 0.09 , $P < 0.01$)。



图 2. RAM11 免疫组织化学染色 ($\times 200$) A 为安慰剂组, B 为小剂量复方丹参滴丸组, C 为大剂量复方丹参滴丸组。

3 讨论

在动脉粥样硬化发生发展的过程中, 粘附因子起着重要的作用^[1-3]。目前血液中可检测到的可溶性粘附因子主要有 ICAM-1、VCAM-1、P 选择素和 E 选择素等。研究表明可溶性粘附因子在急性心肌梗死和不稳定型心绞痛时明显增高, 在预测急性冠状动脉综合征的发生和预后方面具有十分重要的作用^[2,3]。Haim 等^[7]发现慢性冠心病患者血清中 ICAM-1 每升高 100 $\mu\text{g/L}$, 将来发生心血管事件的几

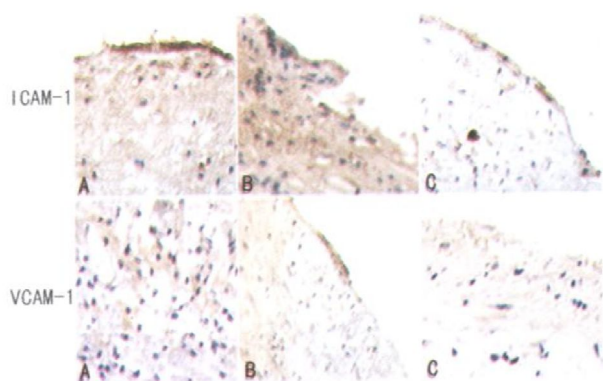


图 3. 细胞间粘附分子 1 和血管细胞粘附分子 1 免疫组织化学染色 ($\times 200$) A 为安慰剂组, B 为小剂量复方丹参滴丸组, C 为大剂量复方丹参滴丸组。

率增高 27%, 其预测价值大于纤维蛋白原。Wallen 等^[8]发现稳定型心绞痛患者血中 VCAM-1 和 ICAM-1 水平的升高提示心脏病性猝死的几率明显增加。

复方丹参滴丸主要由丹参、三七、冰片组成, 该复方有效成分纯度高, 分散均匀, 溶出速度快, 可直接经粘膜快速吸收入血, 无肝脏首过效应, 大大提高生物利用度。在本实验中复方丹参滴丸可以降低 IMT, 升高 AIIc%, 同时有降低外周血 hs-CRP 的趋势。复方丹参滴丸通过降低动脉粥样硬化斑块处 ICAM-1 和 VCAM-1 的分布及其 mRNA 的表达, 同时减少斑块内部巨噬细胞的聚集, 抑制动脉粥样硬化炎症, 从而起到延缓动脉粥样硬化发展的作用。提示复方丹参滴丸可以抑制动脉粥样硬化炎症, 其抑制粘附因子的表达可能是其消退动脉粥样硬化斑块的重要机制。

目前已经公认调脂治疗对动脉粥样硬化有较好的疗效, 国际上已经有许多大规模的实验证实^[9,10]。积极调脂治疗在动脉粥样硬化性冠心病的防治中的首要地位已经得到广泛的认可。本实验发现, 复方丹参滴丸可以降低血中 TG、TC 和 LDLC 水平, 升高

HDLc 水平。复方丹参滴丸调节血脂的作用在冠心病心绞痛的治疗中也显示出良好的调节血脂作用^[11,12]。同时本实验结果证实大剂量复方丹参滴丸的调脂作用可能更好。

本实验结果证明, 复方丹参滴丸可以通过抑制粘附因子的表达以及调节血脂起到延缓动脉粥样硬化进展的作用。

[参考文献]

- [1] O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content [J]. *Circulation*, 1996, **93** (4): 672-682.
- [2] Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM, et al. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: The Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) Study [J]. *Circulation*, 1997, **96** (12): 4 219-225.
- [3] 朱靖, 葛志明. 急性冠状动脉综合征患者血清可溶性细胞粘附因子 1 和妊娠相关血浆蛋白 A 的变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (4): 347-350.
- [4] 向志军, 赵广荣, 英进, 郭治昕. 复方丹参的体外抗氧化活性研究[J]. *中草药*, 2006, **37** (2): 211-213.
- [5] Constantinides P, Chakravarti RN. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures [J]. *Arch Pathol*, 1961, **72** (8): 197-208.
- [6] 陈文强, 张运, 张梅, 季晓平, 林晨, 朱永峰, 等. 外源性人野生型 p53 基因转染导致兔动脉硬化斑块的不稳定性[J]. *中华医学杂志*, 2004, **84** (1): 43-47.
- [7] Haim M, Tanne D, Boyko V, Reshef T, Goldbourt U, Leor J, et al. Soluble intercellular adhesion molecule-1 and long-term risk of acute coronary events in patients with chronic coronary heart disease [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, **39** (7): 1 133-138.
- [8] Wallen NH, Held C, Reqvist N, Hjendahl P. Elevated serum intercellular adhesion molecule-1 and vascular adhesion molecule-1 among patients with stable angina pectoris who suffer cardiovascular death or nonfatal myocardial infarction [J]. *Eur Heart J*, 1999, **20** (14): 1 039-043.
- [9] LaRose JC, Grundy SM, Waters PD, Shear C, Barter P, Fruchart JC, et al. Intensive lipid lowering with atorvastatin patients with stable coronary disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, **352** (14): 1 425-435.
- [10] Nissen SE, Tuzzeu EM, Schoenhagen P, Brown BG, Ganz P, Vogel RA, et al. Effect of intensive compared moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis [J]. *JAMA*, 2004, **291** (9): 1 071-080.
- [11] 刘宗莲, 高淑英, 邓洁, 李辉. 复方丹参滴丸治疗冠心病心绞痛疗效分析[J]. *中成药*, 1997, **19** (7): 19-21.
- [12] 丁晓明, 贾利中, 王昌华. 复方丹参滴丸治疗稳定性心绞痛疗效比较[J]. *苏州医学院学报*, 1999, **19** (5): 511-513.

(此文编辑 文玉珊)