

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2011)19-08-0660-05

## 脑心通对兔动脉粥样斑块形成及高敏 C 反应蛋白的影响

田永波<sup>1,2</sup>, 王东琦<sup>2</sup>, 雷新军<sup>2</sup>, 崔长琮<sup>2</sup>, 李红兵<sup>2</sup>

(1 西安交通大学第一附属医院心内科, 陕西省西安市 710061; 2 宝鸡市中医医院心内二科, 陕西省宝鸡市 721001)

[关键词] 动脉粥样硬化; 脑心通; 高敏 C 反应蛋白; 球囊损伤; 高脂血症

[摘要] **目的** 观察脑心通对动脉粥样斑块形成及 C 反应蛋白的影响。**方法** 36 只雄性新西兰纯种大白兔完全随机分成球囊损伤+高脂喂养(模型组)、球囊损伤+高脂和脑心通喂养(脑心通组)、球囊损伤+高脂和辛伐他汀喂养(辛伐他汀组)。于喂养前、喂养后第 8 周、第 16 周分别检测总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯和高敏 C 反应蛋白水平,并于第 16 周处死动物行病理检查。**结果** 与喂养前比较,模型组、脑心通组和辛伐他汀组总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯升高( $P < 0.01$ ),脑心通组和辛伐他汀组高密度脂蛋白胆固醇升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,脑心通组总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇差异有显著性( $P < 0.05$ )。与喂养前比较,模型组、脑心通组、辛伐他汀组 C 反应蛋白渐升,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),喂养后脑心通组、辛伐他汀组与模型组比较显著降低( $P < 0.01$ )。模型组、脑心通组、辛伐他汀组的主动脉均有粥样斑块形成,脑心通组斑块厚度( $0.77 \pm 0.16$  mm)虽较辛伐他汀组( $0.39 \pm 0.21$  mm)厚( $P < 0.05$ ),但较模型组( $1.58 \pm 0.34$  mm)薄,差异有显著性( $P < 0.01$ )。**结论** 脑心通理论代表药脑心通延缓动脉粥样硬化斑块的形成作用可能与其降脂及降低 C 反应蛋白水平、抗炎有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Effects of Naoxintong on the Plaques Formation of Aorta and C-Reactive Protein in Hypercholesterolemia Rabbit

TIAN Yong-Bo<sup>1,2</sup>, WANG Dong-Qi<sup>2</sup>, LEI Xin-Jun<sup>2</sup>, CUI Chang-Cong<sup>2</sup>, and LI Hong-Bin<sup>2</sup>

(1 Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061; 2 Department of Cardiology, Baoji City Hospital of Chinese Medicine, Baoji Shaanxi 721001, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Naoxintong; High-Sensitivity C-Reactive Protein; Balloon Injury; Hypercholesterolemia

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of Naoxintong on the plaques formation of abdominal aorta and C-reactive protein (CRP) in hypercholesterolemia rabbits. **Methods** 36 male New Zealand White rabbits were equally divided into 3 groups at random: balloon injury + high lipid diet (model group), balloon injury + high lipid diet + Naoxintong (Naoxintong group), balloon injury + high lipid diet + simvastatin (simvastatin group). They were all fed for 16 weeks. The CRP concentrations were detected by enzyme-linked immunosorbent assay, and the histopathological changes of the aortas were detected at the end of the study. **Results** Compared with 0 week, serum total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDLC) and triglyceride (TG) of three groups were higher in the 8th week and 16th week ( $P < 0.01$ ), high-density lipoprotein cholesterol (HDLC) was higher in Naoxintong group and simvastatin group ( $P < 0.05$ ); Compared with model group, there were significant difference in TC, LDLC, HDLC of Naoxintong group. Compared with 0 week, the levels of CRP were significantly increased in three groups ( $P < 0.01$ ), and at the end of the study, the CRP levels were significantly decreased in Naoxintong group and simvastatin group compared with model group ( $P < 0.01$ ). Compared with Naoxintong group, plaques thickness of model group was significantly different ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Naoxintong decreased the plasma cholesterol and CRP concentrations and resisted the inflammatory function, which may inhibit the formation of plaques of abdominal aortas in cholesterolemia rabbit.

[收稿日期] 2011-04-15

[作者简介] 田永波, 主治医师, 主要从事动脉粥样硬化及冠状动脉介入治疗临床工作, Email为 tybotybc@sina.com。通讯作者王东琦, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病介入、心脏起搏与电生理的治疗和研究。雷新军, 博士, 副教授, 主要从事冠心病介入和动脉粥样硬化的治疗和研究。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 病变是动脉内膜不对称的局灶性增厚, 由细胞、结缔组织脂质和碎片组成。动脉粥样斑块形成早期为脂质条纹, 是由充满脂质的细胞在内皮组织下沉积形成。其发病机制主要存在脂质浸润、内皮损伤和炎症反应 3 种学说。脂质异常和炎症反应贯穿于 As 的启动、形成和发展以及不稳定斑块<sup>[1,2]</sup>。脑心通是经国家药监局批准、由陕西步长制药有限公司生产的中成药。经多年临床实践证实脑心通对动脉粥样硬化及其所致的血管疾病有一定的作用。推测其抗动脉粥样硬化作用与调脂、抗炎有关。本实验旨在通过家兔粥样斑块模型对主动脉粥样斑块形成、血脂和高敏 C 反应蛋白 (high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP) 的影响, 探讨脑心通的抗动脉粥样硬化机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

纯系新西兰大白兔 36 只, 雄性, 体重 1.8~2.5 kg (西安交通大学医学院动物中心提供)。喂养符合《中华人民共和国卫生部实验动物标准》。随机平均分成三组: ①球囊损伤 + 高脂喂养 (模型组); ②球囊损伤 + 高脂和脑心通喂养 [脑心通组, 脑心通由陕西步长制药有限公司提供, 剂量为 0.5 g/(kg·d)]; ③球囊损伤 + 高脂和辛伐他汀喂养 [辛伐他汀组, 辛伐他汀由默沙东公司提供, 剂量为 5 mg/(kg·d)]。共喂养 16 周, 每只喂食 120~140 g/d。球囊损伤、高脂喂养及加药处理均从 0 周开始。高脂饲料为以 1% 胆固醇、84% 普通粉状饲料、10% 蛋黄粉及 5% 猪油经加热混匀而制成的颗粒状饲料。脑心通和辛伐他汀均通过胃管注入。实验最后模型组因感染死亡 1 只, 其余组动物全部存活。

### 1.2 腹主动脉球囊拉伤术

戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 经耳缘静脉麻醉动物, 解剖暴露右侧股动脉并穿刺右侧股动脉穿刺成功后, 沿 0.014 导丝把直径为 3.5 mm、长为 15 mm 的球囊导管送入髂动脉、腹主动脉、胸主动脉段 (距股动脉切口约 20 cm), 8 个大气压充盈球囊回拉至髂动脉分叉处, 反复回拉损伤内膜 3 次。

### 1.3 血脂检测

分别测定喂养前、第 8 周和第 16 周血清中血脂, 禁食 12 h 以上, 测定体重后, 经耳缘静脉抽取空腹血, 检测总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC), 应用公式  $LDLC =$

$TC - HDLC - TG / 2.2$  计算低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC)。

### 1.4 高敏 C 反应蛋白含量的测定

所有血浆标本置于 -70℃ 冰箱保存。标本收集齐后采用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 分别测定喂养前、第 8 周和第 16 周血浆中 hs-CRP (试剂盒由 R&D 上海森雄科技实业有限公司提供) 水平, 检测灵敏度为 1 ng/L。严格按照试剂盒和酶标仪说明书提示的步骤进行操作, 批内变异系数和批间变异系数均 < 10%, 每份样品均设复孔。

### 1.5 病理学检查

**1.5.1 标本大体形态观察** 于第 16 周经耳缘静脉注射过量的 3% 戊巴比妥钠处死实验兔, 处死前静脉推注肝素 10 U 以抗凝。开腹取出腹主动脉和胸主动脉全部, 纵行切开, 生理盐水冲洗干净后, 苏丹染色, 观察斑块大小。

**1.5.2 组织病理学检查** 截取三组腹主动脉和胸主动脉段, 取腹主动脉 1 cm, 立即放入 10% 福尔马林内浸泡固定。24 h 后经组织制片, 给予苏木素-伊红 (HE) 染色及 Masson's 三色染色。

**1.5.3 电镜观察** 应用透射电镜观察斑块形成情况。标本以戊二醛和锇酸双重固定, 脱水、置换、干燥、粘托、喷金后, 通过环氧树脂包埋及硬化剂、加速剂、增塑剂的调配, 超薄切片机切成 70 nm 的薄片, 重金属染色, 透射电镜观察血管的斑块部位超微结构。

### 1.6 统计学处理

所有实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 输入 SPSS for windows 统计软件包进行统计分析, 组内各时间点采用重复测量数据的方差分析来进行比较, 组间比较采用 One-Way ANOVA 方法比较。P < 0.05 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 脑心通对血脂的影响

各组血浆 TC 和 LDLC 第 8 周和第 16 周较喂养前显著升高 (P < 0.01); 第 8 周及第 16 周时脑心通组虽较辛伐他汀组 TC 水平高 (P < 0.01), 但与模型组比较显著降低 (P < 0.01); 模型组第 16 周时血浆 TC 和 LDLC 较第 8 周无明显变化, 但脑心通组第 16 周时较第 8 周有明显降低 (P < 0.05)。模型组 HDLC 第 16 周时无明显变化, 脑心通组虽显著低于辛伐他汀组 (P < 0.01), 但显著高于模型组 (P <

0.05), 且较第 8 周时显著升高 ( $P < 0.05$ )。第 16 周时脑心通组 TG 与模型组比差异无显著性, 但辛伐他汀组有明显降低 ( $P < 0.05$ , 表 1)。以模型组第 16 周 TC 和 LDLC 值为基线值, 脑心通组第 16 周 TC

和 LDLC 较模型组分别下降了 26.8%、21.9%, 辛伐他汀组第 16 周 TC 和 LDLC 较模型组分别下降了 67.9%、46.2%。

表 1. 各组动物血脂水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L,  $n = 12$ )

Table 1. Lipid levels of three groups

分组	TC	LDLC	HDLc	TG
模型组				
喂养前	1.62 ± 0.13	0.87 ± 0.10	0.46 ± 0.30	1.04 ± 0.18
第 8 周	42.35 ± 4.21 <sup>b</sup>	8.43 ± 0.83 <sup>b</sup>	0.44 ± 0.07	2.81 ± 0.50 <sup>b</sup>
第 16 周	43.28 ± 4.14 <sup>b</sup>	8.48 ± 0.98 <sup>b</sup>	0.46 ± 0.07	2.69 ± 0.53 <sup>b</sup>
脑心通组				
喂养前	1.87 ± 0.13	1.08 ± 0.11	0.54 ± 0.32	1.14 ± 0.23
第 8 周	35.71 ± 1.29 <sup>bh</sup>	7.14 ± 0.19 <sup>bch</sup>	0.64 ± 0.06 <sup>aceg</sup>	2.35 ± 0.38 <sup>ag</sup>
第 16 周	31.7 ± 0.63 <sup>bch</sup>	6.62 ± 0.26 <sup>bch</sup>	0.74 ± 0.08 <sup>aceg</sup>	2.43 ± 0.39 <sup>ag</sup>
辛伐他汀组				
喂养前	1.73 ± 0.13	0.98 ± 0.13	0.49 ± 0.37	0.89 ± 0.25
第 8 周	23.34 ± 0.85 <sup>bf</sup>	4.20 ± 0.15 <sup>bf</sup>	0.89 ± 0.04 <sup>bf</sup>	1.09 ± 0.12 <sup>af</sup>
第 16 周	13.89 ± 0.44 <sup>bdf</sup>	4.56 ± 0.22 <sup>bef</sup>	1.01 ± 0.05 <sup>bef</sup>	1.07 ± 0.12 <sup>ace</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与喂养前相比; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ , 与第 8 周相比; e 为  $P < 0.05$ , f 为  $P < 0.01$ , 与模型组同时期相比; g 为  $P < 0.05$ , h 为  $P < 0.01$ , 与辛伐他汀组同时期相比。

## 2.2 脑心通对高敏 C 反应蛋白含量的影响

三组兔血浆 hs-CRP 基础水平很低, 组间比较差异无显著性。三组喂养 8 周后 hs-CRP 水平都明显升高 ( $P < 0.01$ ), 脑心通组虽比辛伐他汀组增加明显 ( $P < 0.01$ ), 但明显低于模型组水平 ( $P < 0.05$ )。第 16 周时模型组 hs-CRP 较第 8 周有所增加, 而脑心通组 hs-CRP 水平较第 8 周时有所降低 ( $P < 0.05$ ), 虽比辛伐他汀组高 ( $P < 0.01$ ), 但与模型组比显著降低 ( $P < 0.01$ ; 表 2)。

表 2. 各组兔血浆 hs-CRP 水平的比较 ( $\bar{x} \pm s$ , mg/L)

Table 2. hs-CRP levels of three groups ( $\bar{x} \pm s$ , mg/L,  $n = 12$ )

分组	n	喂养前	第 8 周	第 16 周
模型组	12	1.08 ± 0.03	5.84 ± 0.29 <sup>b</sup>	6.16 ± 0.31 <sup>b</sup>
脑心通组	12	1.08 ± 0.04	4.76 ± 0.31 <sup>beg</sup>	4.03 ± 0.42 <sup>befg</sup>
辛伐他汀组	12	1.05 ± 0.02	3.03 ± 0.28 <sup>bf</sup>	2.34 ± 0.29 <sup>adf</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与喂养前比较; c 为  $P < 0.05$ , d 为  $P < 0.01$ , 与第 8 周比较; e 为  $P < 0.05$ , f 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; g 为  $P < 0.01$ , 与辛伐他汀组比较。

## 2.3 病理学检查

肉眼观察可见模型组腹主动脉内膜苏丹 III 染色显示阳性区广泛, 有明显粥样斑块形成, 脂质斑块增厚卷曲, 弥漫至整个腹主动脉管壁。脑心通组可见斑块成颗粒状, 较薄, 面积虽大于辛伐他汀组, 但显著小于模型组 (图 1)。



图 1. 三组兔腹主动脉苏丹 III 染色结果 (1×) 从左至右依次为模型组、脑心通组和辛伐他汀组。

Figure 1. Rabbit abdominal aorta stained Sudan III (1×)

光镜 HE 染色可见模型组粥样斑块形成, 内皮细胞消失, 粥样斑块明显增厚, 大量无定形坏死物聚集, 并可见灶状泡沫细胞及炎细胞浸润, 病变累及肌层浅肌层; 脑心通组斑块厚度虽较辛伐他汀组增厚, 但明显较模型组薄, 由少量泡沫细胞聚集, 肌层及外膜无明显异常; 辛伐他汀组斑块最少 (图 2)。脑心通组斑块厚度 ( $0.77 \pm 0.16$  mm) 较模型组 ( $1.58 \pm 0.34$  mm) 减少了 51.2% ( $P < 0.01$ ), 辛伐他汀组斑块厚度 ( $0.39 \pm 0.21$  mm) 较模型组减少了 75.3% ( $P < 0.01$ )。

光镜 Masson's 三色染色可见模型组胶原细胞分布不均, 有部分溶解; 脑心通组胶原细胞分布较为均匀, 几乎没有溶解; 辛伐他汀组胶原细胞分布均匀, 位于内膜表面, 没有溶解 (图 3)。

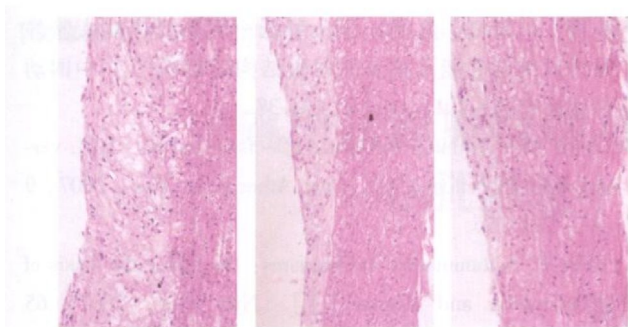


图 2. 兔腹主动脉切片 HE 染色结果 (10 × 40) 从左至右依次为模型组、脑心通组和辛伐他汀组。

Figure 2. HE stained sections of rabbit abdominal aorta

透射电镜下可见模型组有大量泡沫细胞形成, 胶原纤维排列紊乱, 有溶解坏死; 脑心通组泡沫细胞

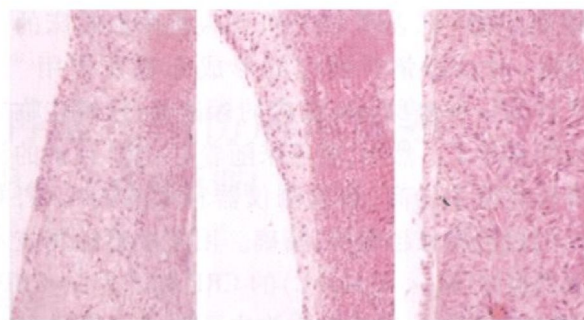


图 3. 兔腹主动脉切片 Masson's 三色染色结果 (10 × 40) 从左至右依次为模型组、脑心通组和辛伐他汀组。

Figure 3. Rabbit aortic slices Masson's trichrome staining

较少, 胶原纤维排列基本正常; 辛伐他汀组几乎没有泡沫细胞, 胶原纤维排列纹理清楚 (图 4)。

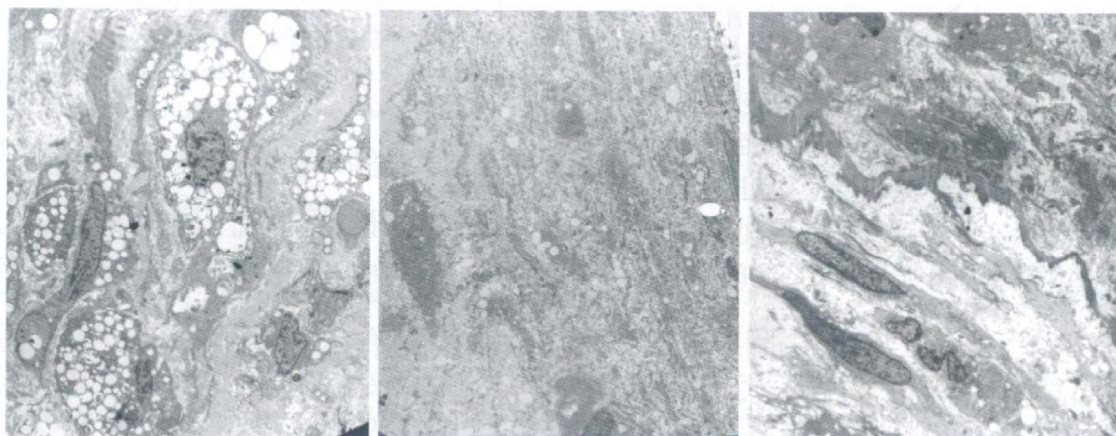


图 4. 兔腹主动脉透射电镜结果 (×2000) 从左至右依次为模型组、脑心通组和辛伐他汀组。

Figure 4. Transmission electron microscopy of rabbit abdominal aorta

### 3 讨论

动脉粥样硬化的发病机制十分复杂, 但血脂的浸润和慢性炎症可能是其中的关键环节。高脂血症是动脉粥样硬化的重要促进因素, LDLC 是动脉粥样硬化的启动因子, ox-LDL 促进内皮细胞吞饮增强, 势必造成细胞表面凹陷的形成和增多, 从而造成细胞内皮功能紊乱, 促进 As 发生<sup>[3]</sup>, 尤其 LDLC 升高和 HDLC 降低, 是高血压、冠心病和脑血管意外的重要危险因素<sup>[4]</sup>。As 是炎症分子和细胞间一系列反应, 由单核巨噬细胞、T 淋巴细胞和肥大细胞等炎症细胞介导, 加重脂质沉积和内皮损伤, 从而导致 As 发生和发展, 且可以促进稳定性斑块发展成为不稳定性斑块。炎症在动脉粥样硬化机制中起到十分重要的作用, 是粥样斑块破裂的关键因素<sup>[5]</sup>。

中成药脑心通由黄芪、丹参、当归、川芎、红花、乳香、桂枝、全蝎、地龙、水蛭等药物制成, 具有益气

活血、化瘀通络的作用。现代药理学证明, 黄芪有抗血栓、保护缺血心肌、强心等作用<sup>[6]</sup>。川芎的有效成分川芎嗪具有抗氧化、抑制炎症反应的作用<sup>[7]</sup>。丹参及其有效成分有降血脂、抗氧化、抗凝血、抗炎等多种作用<sup>[8]</sup>。脑心同治理论代表药脑心通具有降脂、缓解心绞痛及治疗冠心病的作用。本研究结果发现高胆固醇饮食后血浆胆固醇水平明显升高, 可见腹主动脉有大量的脂纹和斑块的形成, 脑心通干预后血浆胆固醇含量、主动脉斑块的面积虽较辛伐他汀组增加, 但与模型组比较则明显减少, 腹主动脉内膜厚度也明显减小, 证明脑心同治理论代表药脑心通具有延缓动脉粥样硬化斑块形成的作用, 更长时间的治疗可能使斑块消退。

C 反应蛋白 (CRP) 主要由肝脏合成, CRP 水平与体内对动脉粥样硬化形成起作用的微生物 (如 CP、HP、HCMV 等) 感染呈正相关<sup>[9]</sup>。进一步研究发现, CRP 浓度与血清抗体阳性的致病微生物的数

目相关。这些都表明 CRP可反映机体亚临床的炎症活动,对动脉粥样硬化的形成起重要作用<sup>[10]</sup>。CRP作为一种全身炎症反应的标记物,已经在临床上应用多年了。然而,近年来随着对 CRP认识的深入和检测技术的高、新检测仪器和试剂的出现,对 CRP的检测越来越敏感、精确。用超敏感检测技术检测的低浓度 (< 10 mg/L)的 CRP称之为 hs-CRP。hs-CRP被认为是炎症标志物中预测心血管事件的最强、最重要的指标<sup>[11]</sup>。hs-CRP是发生心血管疾病的独立预测指标,且 CRP能增强 LDLC及代谢综合征对心血管事件的预测信息<sup>[12]</sup>。腹主动脉损伤后血清中 CRP急剧升高,再予高脂喂养,进一步加重了炎症反应,使动脉内膜进一步受损,加速了斑块的形成。脑心通喂养后可见斑块大小、厚度、面积均较模型组明显降低,并且其 hs-CRP也显著低于模型组。这说明脑心通可能有调脂、抗炎的作用。

本研究显示,脑心同治理论代表药步长脑心通有调脂、抗炎和延缓动脉粥样硬化形成的作用。若步长脑心通在人体亦能产生相同的作用,则脑心通将成为临床上防治心脑血管病的好药,也使祖国医药在防治心脑血管疾病方面开辟更广阔的前景。

#### [参考文献]

- [1] Saeely CH, Drexel H, Sourij H, et al. Key role of postchallenge hyperglycemia for the presence and extent of coronary atherosclerosis: an angiographic study [J]. *Atherosclerosis* 2008, 8 [Epub ahead of Print].
- [2] Devaraj S, Rogers J, Jialal I. Statins and biomarkers of inflammation [J]. *Curr Atheroscler Rep* 2007, 9(1): 33-41.

- [3] 郭卿, 刘慧亮, 董敏. 氧化型低密度脂蛋白对人脐静脉内皮细胞功能及膜表面超微结构的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(1): 34-38
- [4] Selwyn AP. Antiatherosclerotic effects of statins: LDL versus non-LDL effects [J]. *Curr Atheroscler Rep* 2007, 9(4): 281-285
- [5] Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease [J]. *Nutr Rev* 2007, 65(12Pt2): S140-S146
- [6] 徐旭, 汤立达, 黄芪的心血管药理作用研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2003, 12(11): 899-901
- [7] 舒冰, 周重建, 马迎辉, 等. 中药川芎中有效成分的药理作用研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(9): 1043-047
- [8] 姜开余, 顾振纶, 阮长耿. 丹参素对 CD11b, P-selectin, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin 表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2000, 16(6): 682-684
- [9] Pence S, Yilmaz G, Yilmaz N, et al. Determination of plasma fibronectin and sHs-C-reactive protein in patients with cerebrovascular events [J]. *Int Clin Pract* 2003, 57: 91-95
- [10] Willerson JT, Ridker PM. Inflammation as a cardiovascular risk factor [J]. *Circulation* 2004, 109(21Suppl 1): 2-10
- [11] Li JJ, Fang CH. C-reactive protein is not only an inflammatory marker but also a direct cause of cardiovascular disease [J]. *Med Hypotheses* 2004, 62: 499-506
- [12] Ursella S, Mazoni M, Portale G, et al. How to use the C-reactive protein in cardiac disease [J]. *Minerva Cardioangi* 2005, 53(1): 59-68

(此文编辑 许雪梅)