

# 心痛泰对动脉粥样硬化兔血脂及主动脉 ox-LDL、IL-1 $\beta$ 的影响

易琼<sup>1</sup>, 李雅<sup>2</sup>, 郭志华<sup>2</sup>, 刘梨<sup>1</sup>, 张建影<sup>1</sup>, 任欣<sup>1</sup>, 申思<sup>1</sup>

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南省长沙市 410007; 2. 湖南中医药大学, 湖南省长沙市 410208)

[关键词] 动脉粥样硬化; 心痛泰; 氧化型低密度脂蛋白; 白细胞介素 1 $\beta$

[摘要] **目的** 观察心痛泰对动脉粥样硬化兔血脂、载脂蛋白 A、B 及主动脉氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)和白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的影响。**方法** 120 只清洁级日本大耳白兔随机分为六组:空白组、模型组、心痛泰高剂量、中剂量和低剂量组、瑞舒伐他汀组,采用高脂喂养加免疫损伤造模,造模同时予以相应药物灌胃。60 天后,采血测定血脂与载脂蛋白。取胸主动脉用免疫组织化学法测定 ox-LDL、IL-1 $\beta$ 。**结果** 与模型组相比,心痛泰中剂量、高剂量组和瑞舒伐他汀组总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、载脂蛋白 B 明显降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),载脂蛋白 A 和高密度脂蛋白明显升高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),主动脉 ox-LDL、IL-1 $\beta$  明显降低( $P < 0.01$ )。**结论** 心痛泰能减轻动脉粥样硬化炎症反应,其作用机制可能是通过降低血脂、减少 ox-LDL、IL-1 $\beta$  的表达减轻血管炎症,以达到抗动脉粥样硬化的目的。

[中图分类号] R285

[文献标识码] A

## Effects of Xin Tong-tai on Blood Lipid, ox-LDL and IL-1 $\beta$ in Aortas of Rabbits with Atherosclerosis

YI Qiong<sup>1</sup>, LI Ya<sup>2</sup>, GUO Zhi-Hua<sup>2</sup>, LIU Li<sup>1</sup>, ZHANG Jian-Ying<sup>1</sup>, REN Xin<sup>1</sup>, and SHEN Si<sup>1</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Xin Tong-tai; Oxidized Low Density Lipoprotein; Interleukin-1 $\beta$

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of Xin Tong-tai (XTT) on levels of serum lipid and apolipoprotein A, B and aortic oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in rabbits with hyperlipidemia.

**Methods** 120 clean grade healthy Japanese rabbits were randomly divided into control group, model group, low-dose XTT group, middle-dose XTT group, high-dose XTT group and rosuvastatin group. All rabbits were sacrificed by high-fat diet and immunologic injury. The drug intervention groups were treated with the corresponding drugs for 60 days, serum lipid and apolipoprotein A, B were tested for determination. Ox-LDL and IL-1 $\beta$  were tested by immunohistochemistry.

**Results** Compared with model group, XTT and rosuvastatin groups could decrease total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL) and apolipoprotein B, the difference was statistically significant ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Compared with model group, XTT and rosuvastatin groups could increase high density lipoprotein and apolipoprotein A, the difference was statistically significant ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). Compared with model group, the decrease of IL-1 $\beta$  and ox-LDL in the middle-dose XTT, high-dose XTT and rosuvastatin groups had statistically significant difference ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The XTT can reduce inflammatory response of atherosclerosis, probably through lowering serum lipid and reducing inflammation.

目前研究表明,动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的核心机制是炎症反应,血管内皮的炎症反应

对 As 的形成和发展有重要作用。炎症反应可致动脉内膜损伤,促进血小板聚集,平滑肌细胞增殖迁

[收稿日期] 2015-04-02

[修回日期] 2015-05-30

[基金项目] 湖南省中医药科研项目(201516)

[作者简介] 易琼,博士研究生,医师,主要从事中医内科学心血管疾病的防治,E-mail 为 ikkyo@sina.com。郭志华,主任医师,教授,博士研究生导师,主要从事心血管疾病的防治研究。通讯作者李雅,博士后,副教授,主要从事中药学教学与科研工作、新药的开发工作,E-mail 为 liya112@163.com。

移,加速动脉硬化的形成;因此,控制炎症反应对 As 的防治有重要意义。本研究采用高脂饲料喂养加免疫损伤造成兔动脉硬化模型,用免疫组织化学法测定主动脉组织氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,ox-LDL)和白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$ )含量,探讨心痛泰抗 As 的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

120 只清洁级健康日本大耳白兔,雄性,10~12 周龄,体重 2.19 $\pm$ 0.135 kg,由湖南中医药大学实验动物中心提供,许可证号 SCXK(湘)2009-0012。单笼饲养,自由饮水,定时定量喂食,实验前适应性喂养 1 周。

1.2 药物及饲料

心痛泰由丹参、川芎、三七、郁金等中草药组成。中草药材由湖南中医药大学附属第一医院药剂科提供。制备过程:中药材按比例,水提取两次,过滤、浓缩,60 $^{\circ}$ C 以下干燥整成品。功效活血化瘀、理气止痛。瑞舒伐他汀钙片(可定,每片 10 mg,INC 公司,进口药品注册证号 H20110563)。兔高脂饲料由湖南中医药大学动物实验中心加工,高脂饲料配方:15%蛋黄粉,2%胆固醇,5%猪油,0.5%胆酸钠,77.5%基础饲料。牛血清白蛋白:每瓶 50 g,瑞士 Roche 公司;卵清白蛋白:每瓶 10 g,美国 Sigma 公司;乌拉坦:山东齐鲁兴华制药有限公司,国药准字 H37022259。

1.3 主要仪器和试剂

电子天平(湘仪天平仪器设备有限公司,TP-2200B);全自动生化分析仪(日本东芝医疗系统株式会社,TBA-120FR);切片机(德国徕卡公司, RM2235);MIAS 图像分析仪(南京奥康仪器分析有限公司,KA-MIAS1);载脂蛋白试剂盒(迈瑞生物有限公司);苏丹红染色剂(广州纳特生物科技有限公司,SP1005);ox-LDL 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,BA0131);IL-1 $\beta$  试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,BA0956)。10%甲醛、油红、石蜡、二甲苯、乙醇等试剂由湖南中医药大学病理学教研室提供。

1.4 模型的建立

参照文献[1-3]配制高脂饲料和静脉用药,适应性喂养 1 周后,用高脂喂养和免疫损伤的方法造模。将 120 只兔随机分为六组:空白组、模型组、心痛泰高剂量、中剂量、低剂量组和瑞舒伐他汀组,每

组 20 只。造模第 1 天、第 7 天耳缘静脉注射 10% 牛血清白蛋白(250 mg/kg),同时卵清白蛋白皮下注射(2.5 mg/kg,1 次/2 天,共 5 次)。造模的第 1 天即开始高脂喂养和药物灌胃。灌胃剂量根据“兔-人的体表面积公式”换算,心痛泰低剂量、中剂量、高剂量组和瑞舒伐他汀组的给药量分别为 2.3 g/kg、4.6 g/kg、9.2 g/kg 和 0.55 mg/kg。模型组和空白组灌服同等体积生理盐水。灌胃量每次 10 mL/kg,连续 60 天。

1.5 观察指标测定

分别于给药 60 天后,空腹耳缘静脉采血,3000 r/min 离心 20 min,取上清液采用全自动生化分析仪测定血清总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein,LDL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein,HDL)和载脂蛋白 A(apolipoprotein A,ApoA)、载脂蛋白 B(apolipoprotein B,ApoB)。实验结束时,所有动物行 25%乌拉坦 4 mL/kg 耳缘静脉麻醉,空气栓塞法处死。冰台无菌操作迅速取主动脉弓下 2.5~4.0 cm 的胸主动脉段,纵行剖开摊平,0.9%生理盐水冲洗后甲醛固定,用做 HE 染色及免疫组织化学监测。

1.6 主动脉组织形态学检查

取主动脉组织,10%中性甲醛固定 48 h,酒精脱水后用 10%甲醛甲酸脱钙液脱钙 10~15 天,包埋、切片(厚约 4~5  $\mu$ m),HE 染色,在 400 倍光镜下观察主动脉的形态结构。

1.7 主动脉 ox-LDL、IL-1 $\beta$  的测定

石蜡切片、脱水、缓冲液洗涤,3%过氧化氢溶液去除内源性过氧化物酶,滴加非免疫动物血清 20 min,滴加一抗,PBS 冲洗,滴加二抗,ABC 复合物,DAB 显色,400 倍光镜下,用 MIAS 图像系统分析,根据免疫组织化学染色阳性细胞数在每一高倍视野中所占比例进行统计。ox-LDL、IL-1 $\beta$  的值采用平均光密度值(IOD)统计。

1.8 统计学分析

计数资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,所有数据均进行正态性检验和方差齐性检验。采用单因素方差分析,组间比较若方差齐使用 LSD 法,方差不齐使用 Tamhane's T2。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心痛泰对血脂及 ApoA、ApoB 的影响

与模型组相比,心痛泰低剂量、中剂量及高剂量

组、瑞舒伐他汀组 TC、TG、LDL 和 ApoB 明显降低( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ),心痛泰中剂量和高剂量组、瑞舒伐他汀组 HDL、ApoA 明显升高( $P < 0.01$ ;表 1-3)。

表 1. 心痛泰对兔血清 TC 和 TG 含量的影响( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)  
Table 1. The effect of XTT on rabbit serum TC and TG( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

分 组	<i>n</i>	TC	TG
空白组	18	1.739 ± 0.287	0.908 ± 0.295
模型组	15	38.802 ± 2.897 <sup>a</sup>	3.809 ± 0.698 <sup>a</sup>
心痛泰低剂量组	14	34.105 ± 2.973 <sup>b</sup>	3.198 ± 0.299 <sup>b</sup>
心痛泰中剂量组	16	30.559 ± 1.798 <sup>bc</sup>	2.510 ± 0.480 <sup>bc</sup>
心痛泰高剂量组	15	30.560 ± 1.819 <sup>bc</sup>	2.509 ± 0.479 <sup>bc</sup>
瑞舒伐他汀组	14	29.702 ± 1.986 <sup>bc</sup>	2.367 ± 0.604 <sup>bc</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与空白组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与模型组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与心痛泰低剂量组比较。

表 2. 心痛泰对兔血清 HDL 和 LDL 含量的影响( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)  
Table 2. The effect of XTT on rabbit serum HDL and LDL( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

分 组	<i>n</i>	HDL	LDL
空白组	18	0.461 ± 0.111	0.469 ± 0.231
模型组	15	2.608 ± 0.504 <sup>a</sup>	22.208 ± 3.401 <sup>a</sup>
心痛泰低剂量组	14	2.891 ± 0.497 <sup>a</sup>	20.619 ± 1.669 <sup>a</sup>
心痛泰中剂量组	16	3.401 ± 0.596 <sup>bc</sup>	18.202 ± 1.981 <sup>bc</sup>
心痛泰高剂量组	15	3.399 ± 0.601 <sup>b</sup>	18.211 ± 1.897 <sup>bc</sup>
瑞舒伐他汀组	14	3.402 ± 0.629 <sup>bc</sup>	17.986 ± 2.078 <sup>bc</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与空白组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与模型组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与心痛泰低剂量组比较。

表 3. 心痛泰对兔血清载脂蛋白 A、B 含量的影响( $\bar{x} \pm s$ , g/L)  
Table 3. The effect of XTT on rabbit serum ApoA and ApoB( $\bar{x} \pm s$ , g/L)

分 组	<i>n</i>	ApoA	ApoB
空白组	18	0.189 ± 0.041	0.021 ± 0.011
模型组	15	0.112 ± 0.039 <sup>a</sup>	0.152 ± 0.031 <sup>a</sup>
心痛泰低剂量组	14	0.145 ± 0.031 <sup>b</sup>	0.129 ± 0.032 <sup>b</sup>
心痛泰中剂量组	16	0.188 ± 0.022 <sup>bc</sup>	0.088 ± 0.032 <sup>b</sup>
心痛泰高剂量组	15	0.189 ± 0.037 <sup>bc</sup>	0.087 ± 0.031 <sup>b</sup>
瑞舒伐他汀组	14	0.186 ± 0.029 <sup>bc</sup>	0.088 ± 0.026 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与空白组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与模型组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与心痛泰低剂量组比较。

## 2.2 心痛泰对主动脉 ox-LDL 和 IL-1β 的影响

心痛泰中剂量和高剂量组、瑞舒伐他汀组主动脉 ox-LDL 和 IL-1β 的含量比模型组低( $P < 0.01$  或

$P < 0.05$ );与心痛泰低剂量组比较,心痛泰中剂量和高剂量组、瑞舒伐他汀组主动脉 ox-LDL 和 IL-1β 的含量有所减低( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ;表 4)。

表 4. 心痛泰对兔主动脉 ox-LDL、IL-1β 的影响( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 4. The effect of XTT on ox-LDL and IL-1 on arterial tissue of rabbits( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	<i>n</i>	ox-LDL	IL-1β
空白组	18	0.184 ± 0.051	0.119 ± 0.029
模型组	15	0.595 ± 0.012 <sup>a</sup>	0.550 ± 0.049 <sup>a</sup>
心痛泰低剂量组	14	0.402 ± 0.059 <sup>b</sup>	0.383 ± 0.0189 <sup>b</sup>
心痛泰中剂量组	16	0.326 ± 0.033 <sup>bc</sup>	0.261 ± 0.0641 <sup>b</sup>
心痛泰高剂量组	15	0.313 ± 0.047 <sup>bc</sup>	0.265 ± 0.0629 <sup>b</sup>
瑞舒伐他汀组	14	0.310 ± 0.020 <sup>bc</sup>	0.257 ± 0.0641 <sup>bc</sup>

a 为  $P < 0.01$ ,与空白组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与模型组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与心痛泰低剂量组比较。

## 2.3 兔主动脉管壁 ox-LDL 和 IL-1β 的表达

空白组兔动脉内膜光滑,平滑肌细胞排列整齐,染色浅。模型组内膜下大量空泡状泡沫细胞,可见明显深棕色颗粒染色。心痛泰低、中、高剂量组和瑞舒伐他汀组动脉内膜泡沫细胞数量较模型组明显减少,深染颗粒较少,其中以心痛泰中、高剂量组和瑞舒伐他汀组泡沫细胞减少更为明显(图 1 和 2)。

## 3 讨 论

As 系指在动脉管壁内膜和内膜下有脂质沉积,同时伴有中层平滑肌细胞向内膜移行、增殖,使内膜增厚而形成粥样脂质斑块或纤维斑块的一种疾病。As 的“损伤-反应”学说表明,高脂血症可促进动脉内皮细胞炎症反应、加速动脉硬化<sup>[4]</sup>,其中,ox-LDL 的形成和巨噬细胞的聚集是 As 早期反应的关键<sup>[5]</sup>;胆固醇和 LDL 进入动脉内皮下层,被吞噬细胞吞噬形成泡沫细胞,泡沫细胞一方面向血管内皮迁移形成脂质斑块<sup>[6]</sup>,另一方面动脉内膜损伤后,巨噬细胞释放 ox-LDL、IL-1β、C 反应蛋白、肿瘤坏死因子、白细胞介素 18 等炎症因子,同时 ox-LDL 可以刺激血管平滑肌细胞转化为合成型<sup>[7-8]</sup>,合成型血管平滑肌细胞具有分泌大量基质金属蛋白酶的功能,基质金属蛋白酶降解细胞外基质,导致斑块破裂,引起急性心脑血管事件<sup>[9]</sup>。他汀类药物可降低炎症因子 IL-1β、ox-LDL 等水平,在 ox-LDL 诱导的巨噬细胞脂质聚集模型中,辛伐他汀可以减少 IL-1β 的分泌。阿托伐他汀能降低血浆黏



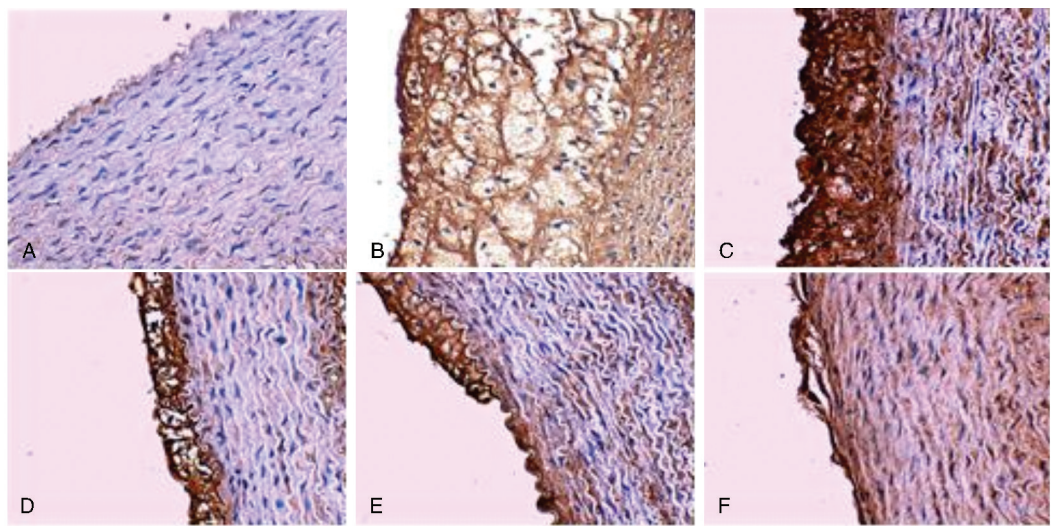


图 1. 主动脉管壁 ox-LDL 的免疫组织化学染色( ×400)      A 为空白组,B 为模型组,C 为心痛泰低剂量组,D 为心痛泰中剂量组,E 为心痛泰高剂量组,F 为瑞舒伐他汀组。

Figure 1. Ox-LDL immunohistochemical staining of rabbit aortic wall( ×400)

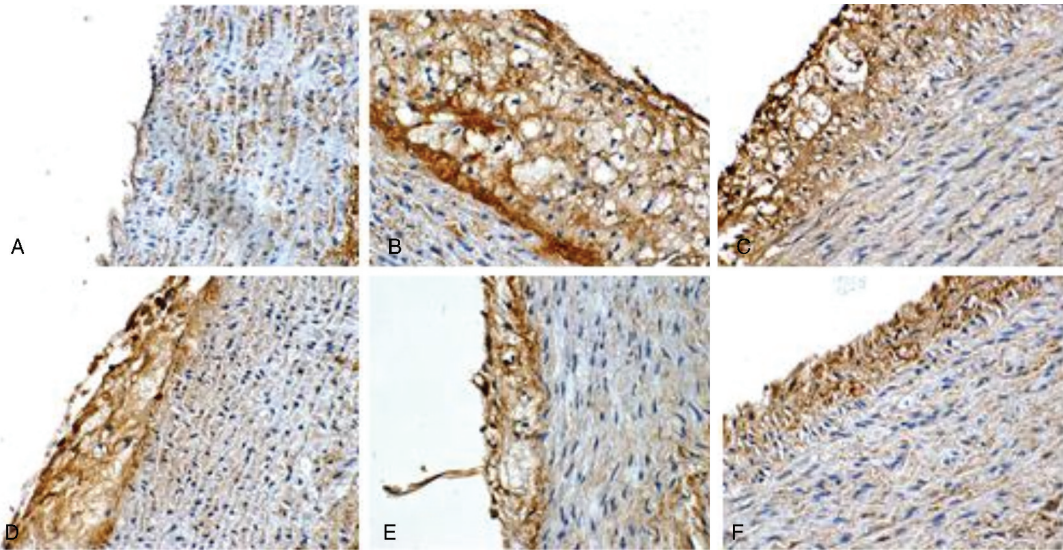


图 2. 主动脉管壁 IL-1β 的免疫组织化学染色( ×400)      A 为空白组,B 为模型组,C 为心痛泰低剂量组,D 为心痛泰中剂量组,E 为心痛泰高剂量组,F 为瑞舒伐他汀组。

Figure 2. IL-1β immunohistochemical staining of rabbit aortic wall( ×400)

度,改善血脂和颈动脉内膜中膜厚度<sup>[10]</sup>。As 在中医学中属于“脉痹”、“胸痹”“真心痛”、“中风”等范畴,病机是气滞痰浊血瘀或阴寒凝滞,最终导致痰瘀互结而酿为本病,病理改变主要是“气滞”、“痰瘀”。其中,病理产物——粥样斑块,属于中医“痰浊”、“瘀血”范畴,其形成与内膜下脂质聚集和炎症反应密切相关。历代医家对“胸痹”的治疗以化痰通络、活血化瘀、疏肝理气、温阳宣痹为法。现代研究表明,很多中草药有抑制血小板聚集,激活纤溶系统,对抗血栓形成,减轻动脉炎症反应的功效<sup>[11]</sup>。在防治冠状动脉支架植入术后血管再狭窄、控制心

律失常、改善心力衰竭等方面,中药发挥了很大的优势<sup>[12]</sup>。心痛泰全方由丹参、川芎、三七、郁金、木香、山楂、枳壳、葛根等药组成,其中丹参以及“血中之气药”川芎,有活血化瘀行气之功,共为君药,三七散瘀消肿止痛,郁金行气解郁,木香理气止痛,山楂行气散瘀共为臣,助君药加强调畅气机之效,佐以枳壳破气、葛根升阳,一升一降共调气机。全方紧扣“理气、活血、化瘀”,诸药配伍,使胸阳振,瘀血散,气机畅,共奏理气活血、化瘀止痛之效。本研究表明,心痛泰低、中、高剂量组均可降低 As 免 TC、TG、LDL 和 ApoB 水平,表明心痛泰一方面可通过改

善血脂降低载脂蛋白达到抗 As。另一方面,心痛泰中、高剂量组可减轻 As 兔动脉组织中 ox-LDL、IL-1 $\beta$  的含量,表明心痛泰抗 As 的另一机制可能是通过减轻动脉管壁的炎症反应来实现的。免疫组织化学染色显示,斑块的厚度,泡沫细胞的堆积情况等均说明了心痛泰中、高剂量组的炎症反应程度较模型组减轻。心痛泰中、高剂量组与心痛泰低剂量组的血脂、ApoA 的改善明显,但各组对 ApoB 的改善尚无差异。因此,心痛泰的最佳抗炎剂量还有待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社第一版, 2001: 87.
- [2] 刘吉勇, 朱惠斌, 陈懿, 等. 脑泰方对家兔动脉粥样硬化模型血脂及血管形态学的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (3): 267-270.
- [3] 章海凤, 刘密, 常小荣, 等. 隔药饼灸对动脉粥样硬化兔主动脉内皮细胞 NF- $\kappa$ B 及 ICAM-1 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28 (4): 914-917.
- [4] 何光朝, 郭纪群, 葛均波. 血脂各成分及其比值与冠状动脉粥样硬化程度的关系[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2013, 7 (16): 7 427-431.
- [5] Yu Xh, Li XX, Zhao GJ, et al. OxLDL up-regulates Niemann-Pick type C1 expression through ERK 1/2/COX-2/

PPAR  $\alpha$ - signaling pathway in macrophages[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2012, 44 (2): 119-128.

- [6] 祝甜甜, 段菊, 张刘强, 等. 巨噬细胞极化在动脉粥样硬化中的作用和药物靶标[J]. 中国药理学通报, 2014, 30 (6): 748-751.
- [7] Van de Woestijne AP, Wassink AM, Monajemi H, et al. Plasma triglyceride levels increase the risk for recurrent vascular events independent of LDL-cholesterol or nonHDL-cholesterol[J]. Int J Cardiol, 2013, 167 (2): 403-408.
- [8] 周晓茂, 魏伟, 陈彤, 等. 24-乙酰泽泻醇 A 对 ox-LDL 诱导大鼠 VSMC 表型转化的影响及其与 ERK1/2 通路的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23 (4): 342-346.
- [9] Nilsson L, Szymanowski A, Swahn E. Soluble TNF receptors are associated with infarct size and ventricular dysfunction in ST elevation myocardial infarction[J]. PLoS One, 2013, 8 (2): e55477.
- [10] 潘利红. 阿托伐他汀钙治疗脑动脉硬化的临床效果分析[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22 (7): 711-714.
- [11] 黄建平. 动脉粥样硬化斑块的中医药治疗思路[J]. 中医杂志, 2005, 46 (4): 303-304.
- [12] 毕颖斐, 毛静远, 王贤良, 等. 中医药防治冠心病临床优势及有关疗效评价的思考[J]. 中医杂志, 2015, 56 (5): 437-441.

(此文编辑 文玉珊)