

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2016)24-12-1214-05

宁心解毒汤、血塞通、瑞舒伐他汀对 ApoE^{-/-} 小鼠炎症因子和 As 斑块的影响

姜红菊¹, 李润智¹, 杜修文², 代君², 韩有为¹, 陈守强¹, 刘桂林¹, 纪孝伟¹

(1. 山东中医药大学第二附属医院心内科, 山东省济南市 250001; 2. 山东中医药大学, 山东省济南市 250355)

[关键词] 动脉粥样硬化; 白细胞介素 6; 白细胞介素 1 β ; 肿瘤坏死因子 α ; 宁心解毒汤; 血塞通; 瑞舒伐他汀

[摘要] **目的** 通过建立 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化 (As) 模型, 探讨宁心解毒汤、血塞通、瑞舒伐他汀对小鼠血脂、炎症因子和斑块结构的影响。**方法** 高脂喂养 80 只 8 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠 4 周后, 随机分为宁心解毒汤组、血塞通组、瑞舒伐他汀组和对照组。药物灌胃 8 周后处死。处死前测量体重、尾动脉血压, 小鼠尾静脉取血, 检测小鼠总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDLC)、白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的浓度。分离主动脉, 观察主动脉粥样硬化斑块特征。**结果** 对照组 ApoE^{-/-} 小鼠血总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇较其他 3 组差异有显著性, 且瑞舒伐他汀组与宁心解毒汤组、血塞通组差异也有显著性 ($P < 0.05$)。对照组 ApoE^{-/-} 小鼠体重、血压较其他 3 组差异无显著性 ($P > 0.05$)。对照组 ApoE^{-/-} 小鼠 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的血清浓度, 明显高于其他 3 组 ($P < 0.05$); 而宁心解毒汤组、血塞通组、瑞舒伐他汀组 3 组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。对照组动脉斑块分布弥漫, 而其他 3 组的整个动脉也有斑块, 明显轻于对照组 ($P < 0.05$)。**结论** ApoE^{-/-} 小鼠+高脂饮食能够理想构建动脉粥样硬化动物模型。宁心解毒汤、血塞通、瑞舒伐他汀可以通过调脂、减低炎症因子的表达来发挥抗 As 作用。瑞舒伐他汀控制斑块发展的效果更好, 考虑与其调脂相关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Ningxin Decoction, Xuesaitong, Rosuvastatin on Inflammatory Cytokines and Atherosclerotic Plaque of ApoE^{-/-} Mice

JIANG Hong-Ju¹, LI Run-Zhi¹, DU Xiu-Wen², DAI Jun², HAN You-Wei¹, CHEN Shou-Qiang¹, LIU Gui-Lin¹, and JI Xiao-Wei¹

(1. The Second Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250001, China; 2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan, Shandong 250355, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; IL-6; IL-1 β ; TNF- α ; Ningxin Jiedu Soup; Xuesaitong; Rosuvastatin[ABSTRACT] **Aim** Through the establishment of atherosclerosis model in ApoE^{-/-} mice to investigate the effects of Ningxin Decoction, Xuesaitong and rosuvastatin on serum lipid, inflammatory factors and plaque structure. **Methods**

Feed 80 ApoE^{-/-} mice aged 8 weeks with high-fat diet for 4 weeks at first. Eighty rats were randomly divided into four groups: Control group ($n=20$), NingxinJiedu Soup group ($n=20$), Xuesaitong group ($n=20$), Rosuvastatin group ($n=20$). Measure the body weight, tail artery blood pressure, detect total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein cholesterol (LDLC) level after eight weeks. Detect the plaque. Analyze the expression level of IL-6, IL-1 β , and TNF- α in the serum of rats. **Results** The ApoE^{-/-} rats in Control group showed apparent differences from other three groups in blood total cholesterol, triglyceride, low density lipoprotein cholesterol. Among them, the ApoE^{-/-} rat in Rosuvastatin group showed apparent differences from NingxinJiedu Soup group and Xuesaitong group. The ApoE^{-/-} rat in Control group had no significant differences from other three groups in body weight, blood pressure. The concentration of IL-6, IL-1 β and TNF- α in serum in Control group were higher than that in other three groups, while there were no obvious

[收稿日期] 2015-03-16

[修回日期] 2016-09-28

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2011HM071)

[作者简介] 姜红菊, 博士, 主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化和冠心病介入治疗, E-mail 为 jianghongju@medmail.com.cn。李润智, 主任医师, 研究方向为胸部疾病的外科治疗, E-mail 为 Lirz@163.com.cn。杜修文, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化和冠心病介入治疗, E-mail 为 dxw20105527@163.com.cn。

differences between the other three groups. **Conclusions** The animal model of atherosclerosis can be ideally established by ApoE^{-/-} rats and high lipid diet. Rosuvastatin has better effect in the control of plaque development, because of its lipid regulating effect. NingxinJiedu soup, Xuesaitong, rosuvastatin can reduce the expression of inflammatory factors. In addition, they also have the positive effect on fat adjustment and retarding atherosclerosis.

中医常把动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)归属为“脉痹”范畴。病机也是多属本虚标实,位多责之于脾肾,本为心脾肾亏虚,标为痰瘀毒三邪内蕴。目前认为“瘀毒致易损斑块”,认为“毒、瘀”是斑块不稳定的重要病机。本研究据此开发了宁心解毒汤,针对急性冠状动脉综合征患者临床运用,观察到了明显的临床疗效,在本课题中将宁心解毒汤运用于 As 动物模型,通过对比血塞通、瑞舒伐他汀来观察宁心解毒汤对 As 作用。

1 材料与方法

1.1 材料

8 周龄雄性载脂蛋白 E 基因敲除 (apolipoprotein E gene knockout, ApoE^{-/-}) 小鼠 80 只,体重 19~22 g,动物的合格证号 Scxk 京 2006-0008(从北京大学实验动物中心购买)。高脂饲料配方:10%猪油+1%胆固醇+0.25%胆盐+基础饲料,北京科澳协力饲料公司生产。

1.2 动物模型的建立

80 只 8 周龄雄性 ApoE^{-/-} 小鼠给予高脂饲料喂养 4 周,然后随机分为对照组、宁心解毒汤组、血塞通组、瑞舒伐他汀组 4 组(每组 20 只)。对照组在高脂饮食基础上给予 0.9% 生理盐水灌胃,每日 1 次,每次 0.1 mL。其他 3 组在高脂饮食的基础上分别给予相应的药物灌胃。治疗 8 周后处死动物。

小鼠宁心解毒汤、血塞通、瑞舒伐他汀的用量,按照成人与小鼠的体重折算系数 9.01 进行折算^[1]。经过计算后,小鼠瑞舒伐他汀(阿斯利康有限公司生产)的用量为 1.5 mg/kg,每只每日量用生理盐水溶成 0.1 mL 灌胃。小鼠血塞通胶囊(昆明圣火药业有限公司生产)的用量为 0.2 mg/kg,每只每日量用生理盐水溶成 0.1 mL 灌胃。小鼠每份宁心解毒汤组成:黄芪 30 g,麦冬 15 g,五味子 3 g,川芎 15 g,丹参 30 g,元胡 20 g,黄连 12 g,半枝莲 15 g,半边莲 15 g,木香 9 g,连翘 15 g,生甘草 6 g,每份水煎后,最终约 10 mL,每只每日小鼠灌胃 0.1 mL。

1.3 体重、血压测量

Apo E^{-/-} 小鼠于处死前称体重,通过鼠尾血压测量仪检测血压,取 3 次测量结果的平均值作为实

验数据。

1.4 血脂和炎症因子的检测

处死前小鼠尾静脉取血,测定血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)水平,计算低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)浓度。ELISA 检测血清中白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平。

1.5 病理组织学观察

药物干预 8 周后的小鼠腹腔注射戊巴比妥钠, PBS 经左心室插管灌注,然后继续灌注 4% 多聚甲醛溶液,分离主动脉,4% 多聚甲醛溶液固定 12 h, OCT 包埋剂进行固定和包埋,冰冻切片机每间隔 50 μ m 连续切片标本,将组织切片贴至载玻片上,挑选切片,进行苏木素-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色、油红 O 染色,观察动脉粥样硬化情况。

1.6 统计学方法

所有资料采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用独立样本的 *t* 检验。计数资料分析采用 χ^2 检验, $n < 40$ 时,采用 Fisher's Exact Test 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况的比较

小鼠喂养过程中生长良好。宁心解毒汤组 1 例分组后 2 周死亡。4 组 ApoE^{-/-} 小鼠随着喂养时间延长体重均在逐渐增加,处死前 4 组小鼠体重经过方差分析组间两两比较差异没有显著性($P > 0.05$), 4 组小鼠血压差异也没有显著性($P > 0.05$; 表 1)。

表 1. 各组小鼠体重、血压的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of blood pressures and weight in each group ($\bar{x} \pm s$)

分组	体重(g)	收缩压(mmHg)	舒张压(mmHg)
对照组	29.00 \pm 2.34	110.00 \pm 4.22	80.50 \pm 6.50
宁心解毒汤组	30.00 \pm 2.56	109.00 \pm 7.31	78.30 \pm 4.92
血塞通组	29.50 \pm 3.14	106.00 \pm 9.45	79.80 \pm 7.12
瑞舒伐他汀组	30.37 \pm 1.56	109.00 \pm 5.63	78.80 \pm 3.34

2.2 各组小鼠血脂水平的比较

处死前,瑞舒伐他汀组静脉血 TC、TG、LDLC 水平较其他 3 组明显降低($P<0.05$),宁心解毒汤组、血塞通组显著低于对照组($P<0.05$;表 2)。

2.3 各组炎症因子水平的比较

ApoE^{-/-}小鼠处死前对照组 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的血浆水平显著高于其他组($P<0.05$),而其他 3 组间无显著差异($P>0.05$;表 3)。

表 2. 各组小鼠 TC、TG、LDLC 水平的比较 (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

Table 2. Comparison of TC, TG and LDLC in each group (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

分组	TC	TG	LDLC
对照组	29.31 \pm 3.82	1.71 \pm 0.35	26.83 \pm 4.71
宁心解毒汤组	24.84 \pm 5.72 ^{ab}	1.23 \pm 0.42 ^{ab}	21.06 \pm 5.13 ^{ab}
血塞通组	24.16 \pm 4.34 ^{ab}	1.21 \pm 0.33 ^{ab}	20.89 \pm 4.51 ^{ab}
瑞舒伐他汀组	17.94 \pm 4.07 ^a	1.04 \pm 0.17 ^a	13.62 \pm 4.39 ^a

a 为 $P<0.05$,与对照组比较;b 为 $P<0.05$,与瑞舒伐他汀组比较。

表 3. 各组小鼠 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平的比较 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x}\pm s$)

Table 3. Comparison of plasma levels of IL-6, IL-1 β and TNF- α in each group ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x}\pm s$)

分组	IL-6	IL-1 β	TNF- α
对照组	115.77 \pm 21.23	13.36 \pm 1.04	1.35 \pm 0.08
宁心解毒汤组	90.88 \pm 12.17 ^a	10.64 \pm 4.81 ^a	0.88 \pm 0.07 ^a
血塞通组	91.31 \pm 11.86 ^a	10.55 \pm 3.27 ^a	0.84 \pm 0.06 ^a
瑞舒伐他汀组	89.83 \pm 14.21 ^a	10.61 \pm 2.59 ^a	0.86 \pm 0.12 ^a

a 为 $P<0.05$,与对照组比较。

2.4 各组主动脉病理组织学改变

各组主动脉粥样硬化斑块油红 O 染色情况(图 1)。对照组可见明显的多处红染,整个动脉斑块分布弥漫。而其他 3 组的整个动脉也有斑块,但是分布明显少于对照组。肉眼所见宁心解毒汤、血塞通组较瑞舒伐他汀组的斑块分布多些。HE 染色对照组见明显动脉粥样硬化斑块,表面大量泡沫细胞覆盖,大量脂质沉积,纤维帽较薄,内膜部分脱落,有斑块破裂增生现象,动脉管壁僵硬,管腔明显狭窄,内膜面弥漫增厚,斑块呈浅黄色,可见融合成片,有些局部隆起,表面不光滑,在外膜可见大量炎细胞浸润。与其他组比较,瑞舒伐他汀组管壁柔软,管腔狭窄程度轻,斑块明显缩小,泡沫细胞及脂质沉积减少,内膜厚度、斑块面积也明显减少,外膜炎性细胞少。宁心解毒汤、血塞通组介于对照、瑞舒伐他汀组之间(图 2)。

2.5 各组主动脉斑块特征比较

主动脉斑块占血管面积、斑块中脂质含量对照组最高,与其他 3 组有显著差异($P<0.05$)。宁心解毒汤、血塞通组脂质含量较瑞舒伐他汀组无显著差别($P>0.05$)。主动脉 HE 染色对照组斑块占血管腔面积比明显高于其他组($P<0.05$)。宁心解毒汤、血塞通组斑块占血管腔面积比无明显差别($P>0.05$),均显著高于瑞舒伐他汀组($P<0.05$;表 4)。

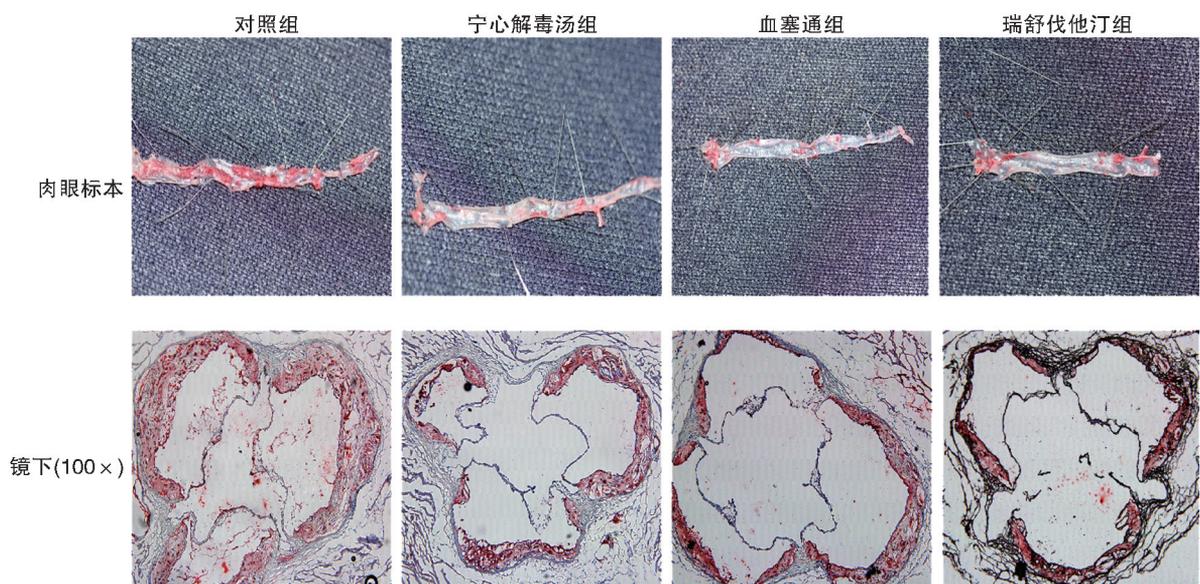


图 1. 各组油红 O 染色结果

Figure 1. The oil red O staining of each group

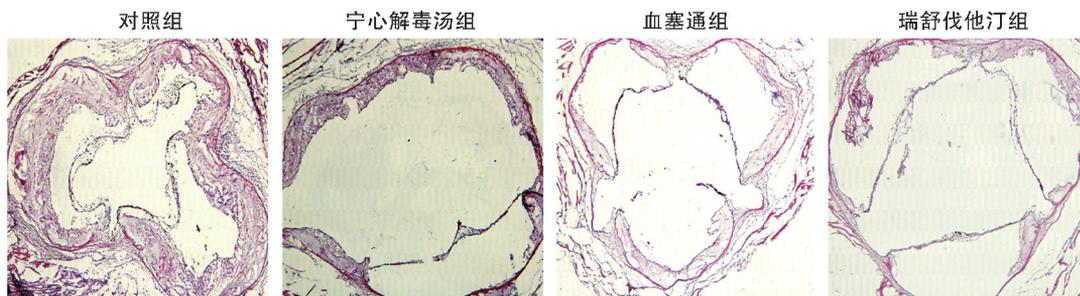


图 2. 各组 HE 染色结果(100×)

Figure 2. HE staining of each group(100×)

表 4. 各组斑块占血管面积、斑块中脂质含量的比较($n=20$, $\bar{x}\pm s$)Table 4. Comparison of plaque area / blood vessels area, lipid concentrations in aortic plaques in each group($n=20$, $\bar{x}\pm s$)

分组	斑块占血管面积	斑块中脂质含量
对照组	62.35%±3.56%	37.2%±4.51%
宁心解毒汤组	51.62%±4.71% ^{ab}	22.35%±3.82% ^a
血塞通组	47.81%±5.06% ^{ab}	20.69%±5.47% ^a
瑞舒伐他汀组	31.66%±1.78% ^a	20.12%±5.48% ^a

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与瑞舒伐他汀组比较。

3 讨论

血脂异常是引起 As 的主要因素,尤其是高胆固醇血症与 As 有着密切的关系。敲除 ApoE 基因后的小鼠,胆固醇就主要存在于 VLDL 中,引起高脂血症,导致 As^[2]。ApoE^{-/-}小鼠喂养高脂饮食可以使血胆固醇水平短时间内达到并持续保持在 15 000 mg/L(38.79 mmol/L)以上,很容易达到致 As 所要求的血脂水平。本研究证实了这一点。本研究发现高脂饮食 ApoE^{-/-}小鼠的血脂水平明显升高,血浆中 TC、LDLC 及 TG 浓度分别达到正常小鼠的 10 余倍,达到了致 As 的条件。

自 1992 年成功培育出 ApoE^{-/-}小鼠后,各国学者利用 ApoE^{-/-}小鼠模型研究 As,发现 ApoE^{-/-}小鼠可自发形成 As,并且其斑块无论是在病理学还是在组织形态学都与人极为相似^[2],使 ApoE^{-/-}小鼠成为目前探讨 As 发生、发展的细胞与分子机制和治疗手段的最佳实验动物模型^[3-5]。本研究中 ApoE^{-/-}小鼠油红 O 染色可见明显主动脉多处红染,显示 As 的形成,在没有进行药物干预小鼠的整个主动脉上 As 斑块弥漫分布。HE 染色也显示整条动脉可见明显的动脉粥样硬化斑块,未进行药物干预的对照组小鼠主动脉可见斑块表面大量泡沫细胞覆盖,大量

脂质沉积,纤维帽较薄,内膜部分脱落,有斑块破裂增生现象,动脉管壁僵硬,管腔狭窄,内膜面弥漫增厚,可见斑块融合成片,有的局部隆起,表面不光滑,外膜可见大量炎细胞浸润。由此可见高脂喂养 ApoE^{-/-}小鼠可成功构建 As 动物模型。

本研究发现药物干预的 3 组小鼠 TC、TG、LDLC 的血浓度较未干预组均减少,药物干预的 3 组小鼠主动脉粥样硬化程度也较未干预组轻,提示宁心解毒汤、血塞通和瑞舒伐他汀都具有调脂和抗 As 作用。本研究中瑞舒伐他汀较宁心解毒汤和三七皂甙有更显著的降血脂作用,并且瑞舒伐他汀组小鼠主动脉斑块面积占血管腔面积比也是最低的,动脉粥样硬化程度最轻,说明瑞舒伐他汀具有更好的抗 As 作用。

As 形成是慢性炎症性疾病。炎症反应时活化的巨噬细胞可释放多种细胞因子(IL-1、IL-6、TNF 等),这些炎症因子和炎症细胞能引起炎症级联反应,引起 As 病变的发生发展^[6]。IL-1 和 IL-6 是重要的炎症介质,是参与心血管病理的重要因子^[7],可导致冠状动脉粥样硬化斑块不稳定^[8]。Spears 等^[9]认为巨噬细胞分泌的细胞因子促使了 As 的发生发展,IL-1 β 在 As 的进展中起主要作用。Lipszyc 等^[10]给老鼠喂养致 As 食物,引起胆固醇升高,并且老鼠血管壁上可以观察到 As 斑块和 IL-1 β 的高表达,说明了 IL-1 β 与 As 有关。TNF- α 存在于 As 组织中,能引起动脉内皮功能紊乱、内膜增生^[11],影响脂质代谢,促炎症细胞的募集和激活,诱导血小板聚集,使得纤维帽变薄,斑块的稳定性变差,并促进 As 的形成和发展,增加心血管疾病的发病率和死亡率^[12]。

本研究发现各药物干预组 As 小鼠血清 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 均低于对照组,说明宁心解毒汤、血塞通、瑞舒伐他汀都有抗炎作用,且各药物干预组的血浆水平无显著差异,说明这 3 种药物对炎症因

子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的作用相似。在斑块的脂质含量方面,瑞舒伐他汀组与血塞通组、宁心解毒汤组无显著差异。推测脂质含量与斑块的稳定性相关,但斑块稳定性可能与炎症关系更密切,当然,本研究有其局限性,尚需进一步深入以明确。

中医学认为 As 的过程就是由痰致瘀、痰瘀互结的病变过程。痰瘀互结,胶结时长,就会蕴积成毒,形成痰瘀毒相互交挟的状况。毒邪最易腐筋伤脉,与不稳定斑块的溃烂、糜烂、炎细胞浸润、出血等变化相关。由此,清热活血解毒法也就成为现在治疗冠心病最重要的新方法,也正是基于上述病机组方了宁心解毒汤,运用于急性冠状动脉综合征患者,已经取得了明确疗效,为了进一步探讨此方作用机制,本研究将此运用于 As 小鼠。此组方具体如下:君药黄芪、丹参、黄连,臣药川芎、生地、元胡、半边莲、连翘,佐药麦冬、五味子、木香,使药甘草。本研究证实此方有明确的抗 As 作用,并且它能够降血脂,能够降低小鼠血清 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的水平,考虑该作用是其抗 As 的部分机制。本研究发见宁心解毒汤与血塞通抗 As 作用相似,综上,宁心解毒汤、血塞通、瑞舒伐他汀可以通过调脂、减低炎性因子的表达,来发挥抗 As 作用。瑞舒伐他汀控制斑块发展的效果更好,考虑与其调脂相关。本研究样本量小,还需进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] 许淑云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 第3版. 北京:人民卫生出版社,2002:202-204.
- [2] Jawien J, Nastalck P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis[J]. *Physiol Pharmacol*, 2004, 55(3): 503-517.
- [3] Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, et al. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E [J]. *Science*, 1992, 258 (5081):

468-471.

- [4] Nakashima Y, Plumb AS, Raines EW, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1994,14 (1): 133-140.
- [5] Plump AS, Smith JD, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES Cells[J]. *Cell*, 1992, 71(10): 343-353.
- [6] Malaud E, Merle D, Piquet D, et al. Local carotid atherosclerotic plaque proteins for the identification of circulating biomarkers in coronary patients[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 233(2): 551-558.
- [7] Libby P. Role of inflammation in atherosclerosis associated with rheumatoid arthritis[J]. *Am J Med*, 2008, 121 (10 Suppl 1): S21-31.
- [8] 彭清,卢建刚,范忠才,等. 动脉粥样硬化大鼠 Chemerin 与炎症的相关性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22 (8): 789-794.
- [9] Spears LD, Razani B, Semenkovich CF. Interleukins and atherosclerosis: a dysfunctional family grows [J]. *Cell Metab*, 2013, 18(5): 614-616.
- [10] Lipszyc PS, Cremaschi GA, Zorrilla-Zubilete M, et al. Niacin modulates pro-inflammatory cytokine secretion, A potential mechanism involved in its anti-atherosclerotic effect[J]. *Open Cardiovasc Med*, 2013, 20(7): 90-98.
- [11] Tam LS, Kitas GD, González-Gay MA. Can suppression of inflammation by anti-TNF prevent progression of sub-clinical atherosclerosis in inflammatory arthritis [J]? *Rheumatology*, 2014, 53(6): 1108-1119.
- [12] Popa C, Netea MG, van Riel PL, et al. The role of TNF- α in chronic inflammatory condition, intermediary metabolism, and cardiovascular risk [J]. *Lipid Res*, 2007, 48(4): 751-762.

(此文编辑 朱雯霞)