

心痛泰通过降低 Lp-PLA2、IL-6、hs-CRP、LOX-1 水平 减轻兔动脉粥样硬化炎症反应

易琼¹, 李雅², 郭志华², 乐金海¹, 任欣³, 申思³

(湖南中医药大学第一附属医院 1.重症医学科,3.老年病科,湖南省长沙市 410007;

2.湖南中医药大学药学院,湖南省长沙市 410208)

[关键词] 心痛泰; 动脉粥样硬化; 脂蛋白相关磷脂酶 A2; 白细胞介素 6; 高敏 C 反应蛋白; 血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1; 兔

[摘要] **目的** 研究心痛泰对动脉粥样硬化兔血清脂蛋白相关磷脂酶 A2(Lp-PLA2)、白细胞介素 6(IL-6)以及主动脉组织高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)和血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1(LOX-1)的影响。**方法** 120 只日本大耳白兔随机分为空白组、模型组、心痛泰低剂量组、中剂量组、高剂量组和瑞舒伐他汀组。采用前瞻性研究,造模的同时予以相应药物灌胃。60 天后采血,测定血清 Lp-PLA2 和 IL-6 水平;免疫组织化学法检测胸主动脉 hs-CRP 和 LOX-1 含量。**结果** 心痛泰低剂量组、中剂量组和高剂量组血清 Lp-PLA2 和 IL-6 水平比模型组低($P<0.01$);与心痛泰低剂量组比较,心痛泰中剂量组和高剂量组、瑞舒伐他汀组血清 Lp-PLA2 和 IL-6 水平降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。心痛泰中剂量组和高剂量组的 hs-CRP 和 LOX-1 表达水平比模型组低($P<0.01$);与心痛泰低剂量组比较,心痛泰中剂量组和高剂量组、瑞舒伐他汀组的 hs-CRP 和 LOX-1 表达水平降低($P<0.05$)。免疫组织化学染色显示,模型组主动脉内膜 hs-CRP 和 LOX-1 大量表达;与模型组比较,心痛泰低剂量组、中剂量组、高剂量组和瑞舒伐他汀组主动脉内膜 hs-CRP 和 LOX-1 表达减轻。**结论** 心痛泰能降低动脉粥样硬化兔 Lp-PLA2、IL-6、hs-CRP、LOX-1 的水平,从而达到抗动脉粥样硬化炎症反应的作用。

[中图分类号] R285

[文献标识码] A

Xin Tong-tai reduces inflammation of atherosclerosis by lowering the levels of Lp-PLA2, IL-6, hs-CRP and LOX-1 in rabbits

YI Qiong¹, LI Ya², GUO Zhi-Hua², LE Jin-Hai¹, REN Xin³, SHEN Si³

(1. Department of Intensive Care Unit, 3. Department of Geriatrics, the First Affiliated Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 2. Pharmaceutical College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[KEY WORDS] Xin Tong-tai; Atherosclerosis; Lipoprotein-associated phospholipase A2; Interleukin-6; High-sensitivity C-reactive protein; Lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of Xin Tong-tai (XTT) on serum lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) and interleukin 6 (IL-6), and aortic tissue high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) and lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in atherosclerotic rabbits. **Methods** A total of 120 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. In this prospective study, the drug intervention groups were treated with the corresponding drugs at the same time. After 60 days, serum levels of Lp-PLA2 and IL-6 were measured; The contents of hs-CRP and LOX-1 in thoracic aorta were detected by immunohistochemistry method. **Results** The serum levels of Lp-PLA2 and IL-6 in low-dose XTT group, middle-dose XTT group and high-dose XTT group were lower than those in model group ($P<0.01$). Compared with low-dose XTT group, the serum levels of Lp-PLA2 and IL-6 were decreased in middle-

[收稿日期] 2016-06-02

[修回日期] 2016-09-02

[基金项目] 湖南省中医药科研项目(201516)

[作者简介] 易琼,博士,主治医师,主要从事心脑血管疾病的防治和重症医学的临床工作,E-mail 为 ikkyo@sina.com。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。

dose XTT group, high-dose XTT group and rosuvastatin group ($P<0.01$ or $P<0.05$). The expression levels of hs-CRP and LOX-1 in middle-dose XTT group and high-dose XTT group were lower than those in model group ($P<0.01$). Compared with low-dose XTT group, the expression levels of hs-CRP and LOX-1 were decreased in middle-dose XTT group, high-dose XTT group and rosuvastatin group ($P<0.05$). Immunohistochemical staining showed that in model group, there was a large amount of hs-CRP and LOX-1 expression in aortic intima; Compared with model group, the expressions of hs-CRP and LOX-1 in the aorta were reduced in low-dose XTT group, middle-dose XTT group, high-dose XTT group and rosuvastatin group. **Conclusion** Xin Tong-tai can decrease the levels of Lp-PLA2, IL-6, hs-CRP and LOX-1 in atherosclerotic rabbits, so as to achieve the effect of reducing atherosclerosis inflammatory reaction.

目前认为炎症反应是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)形成与发展的主要机制。中药在控制 As 炎症方面发挥了重要作用;前期实验表明心痛泰可降低血脂、减轻 As 炎症反应。本实验以 As 兔为对象,测定血清脂蛋白相关磷脂酶 A2 (lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2) 和白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 水平,及主动脉高敏 C 反应蛋白 (high-sensitivity C-reactive protein, hs-CRP) 和血凝素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1, LOX-1) 的含量,进一步为心痛泰抗 As 炎症提供实验依据。

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,体质量 2.19 ± 0.14 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,合格证号:湘医动字 D20-006 号。单笼饲养。

1.2 药物与饲料

心痛泰由丹参、川芎、三七、郁金等中草药组成,上述炮制合格饮片经过混合均匀、粉碎、过筛、起膜、泛丸、过滤抛光、分量包装、质检后,入库保存。由湖南中医药大学第一附属医院制剂室制备成药。每克药粉相当于 15 g 生药。功效:活血化瘀、理气止痛。瑞舒伐他汀钙片(商品名:可定,每片 10 mg,生产企业:阿斯利康制药有限公司,进口药品注册证号:H20110563)。高脂饲料由湖南中医药大学动物实验中心加工,配方:15%蛋黄粉,2%胆固醇,5%猪油,0.5%胆酸钠,77.5%基础饲料。

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);820 Histo Stat 切片仪(Reichert 公司);MIAS 图像分析仪(南京奥康仪器分析有限公司, KA-MIAS1)。牛血清白蛋白(瑞士 Roche, 批号

738328);卵清白蛋白(美国 Sigma, A5253);Lp-PLA2 试剂盒(北京乐博生物科技有限公司, ORB58735);IL-6 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, EK0777);hs-CRP 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, EK0977);LOX-1 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, EK0824);10%甲醛、油红、石蜡、二甲苯等试剂由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.4 模型的建立

模型建立参照文献[1-3]。120 只兔适应性喂养 1 周后,按随机数字表法分为空白组、模型组、心痛泰低、中、高剂量组、瑞舒伐他汀组,每组 20 只,造模过程中每组有不同数量兔子死亡。造模同时进行药物干预。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是 2.3、4.6、9.2 g/kg 和 0.55 mg/kg。空白组和模型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 Lp-PLA2、IL-6 测定和免疫组织化学检测

实验结束时,空腹耳缘静脉采血,全自动生化分析仪测定血清 Lp-PLA2 和 IL-6 水平。实验结束时,所有动物用 25%乌拉坦 4 mL/kg 静脉麻醉,空气栓塞法处死,取主动脉弓下 2.5~3.5 cm 的胸主动脉段,用做免疫组织化学检测。

1.6 主动脉 hs-CRP、LOX-1 的测定

主动脉石蜡切片、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,磷酸盐缓冲液冲洗,滴加二抗、ABC 复合物(卵白素-生物素-过氧化物酶复合物),联苯二胺显色,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。hs-CRP、LOX-1 的值采用积分光密度(integral optical density, IOD)值统计。

1.7 统计学分析

使用 SPSS 19.0 分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。所有数据均进行正态检验和方差齐性检验。若符合正态分布,用单因素方差分析。组间比较,方差齐选 LSD 法,方差不齐选 Tamhane's T2 法。 $P<$

0.05 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 心痛泰对兔血清 Lp-PLA2 和 IL-6 的影响

心痛泰低剂量组、中剂量组和高剂量组的 Lp-PLA2 和 IL-6 比模型组低 ($P < 0.01$); 与心痛泰低剂量组比较, 心痛泰中剂量组和高剂量组、瑞舒伐他汀组 Lp-PLA2 和 IL-6 的水平降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$; 表 1)。

表 1. 心痛泰对兔血清 Lp-PLA2 和 IL-6 含量的影响 ($\mu\text{g/L}$)
Table 1. Effects of Xin Tong-tai on serum levels of Lp-PLA2 and IL-6 in rabbit ($\mu\text{g/L}$)

分 组	n	Lp-PLA2	IL-6
空白组	18	106.473±3.291	63.532±3.275
模型组	15	237.528±4.352 ^a	124.752±4.619 ^a
心痛泰低剂量组	14	145.032±2.815 ^b	96.214±5.233 ^b
心痛泰中剂量组	16	141.425±2.593 ^b	78.256±3.481 ^{bc}
心痛泰高剂量组	15	128.541±4.372 ^{bc}	75.318±2.936 ^{bc}
瑞舒伐他汀组	14	125.762±5.386 ^{bc}	68.427±3.125 ^{bc}

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 兔主动脉 hs-CRP 和 LOX-1 的表达

心痛泰中剂量组和高剂量组的 hs-CRP 和 LOX-1

表达水平比模型组低 ($P < 0.01$); 与心痛泰低剂量组比较, 心痛泰中剂量组和高剂量组、瑞舒伐他汀组的 hs-CRP 和 LOX-1 表达水平降低 ($P < 0.05$; 表 2)。

表 2. 心痛泰对兔主动脉 hs-CRP、LOX-1 表达的影响 (IOD 值)
Table 2. Effects of Xin Tong-tai on the expressions of hs-CRP and LOX-1 in rabbit aorta (IOD value)

分 组	n	hs-CRP	LOX-1
空白组	18	0.232±0.026	0.124±0.028
模型组	15	0.873±0.092 ^a	0.629±0.065 ^a
心痛泰低剂量组	14	0.614±0.051 ^a	0.513±0.014 ^a
心痛泰中剂量组	16	0.547±0.036 ^{bc}	0.487±0.033 ^{bc}
心痛泰高剂量组	15	0.466±0.027 ^{bc}	0.362±0.031 ^{bc}
瑞舒伐他汀组	14	0.498±0.035 ^{bc}	0.351±0.053 ^{bc}

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 hs-CRP 和 LOX-1 免疫组织化学检测结果

空白组内膜光滑, 平滑肌细胞结构整齐, 呈淡蓝色浅染。模型组内膜增厚, 棕色深染, 内膜下大量脂质浸润和泡沫细胞堆积, hs-CRP 和 LOX-1 在内膜下有大量阳性表达。心痛泰低、中、高剂量组和瑞舒伐他汀组的动脉内膜脂质浸润比模型组明显减轻, 深染范围减少, hs-CRP 和 LOX-1 阳性表达较模型组减轻 (图 1 和 2)。

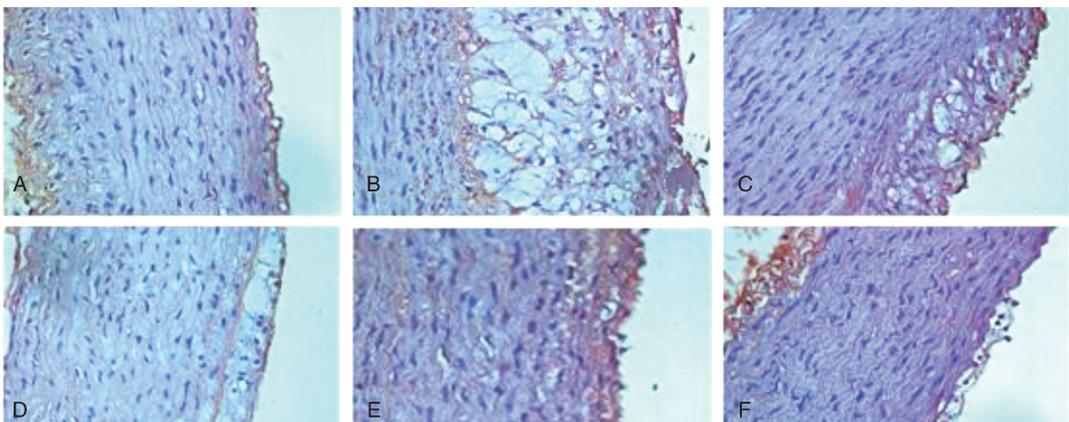


图 1. 兔主动脉管壁 hs-CRP 的免疫组织化学染色 (400×) A 为空白组, B 为模型组, C 为心痛泰低剂量组, D 为心痛泰中剂量组, E 为心痛泰高剂量组, F 为瑞舒伐他汀组。

Figure 1. Immunohistochemical staining of hs-CRP in rabbit aortic wall (400×)

3 讨论

动脉粥样硬化是各种原因导致动脉管壁内膜下脂质沉积而形成斑块的一种疾病, 其引发的冠心病、

脑梗死等对人类的健康构成巨大威胁。研究发现, 炎症反应贯穿于 As 的全过程。中药对于治疗动脉粥样硬化有独特的作用, 中药复方制剂有多靶点、多途径抗动脉粥样硬化的作用。中医认为, As 病因是由于

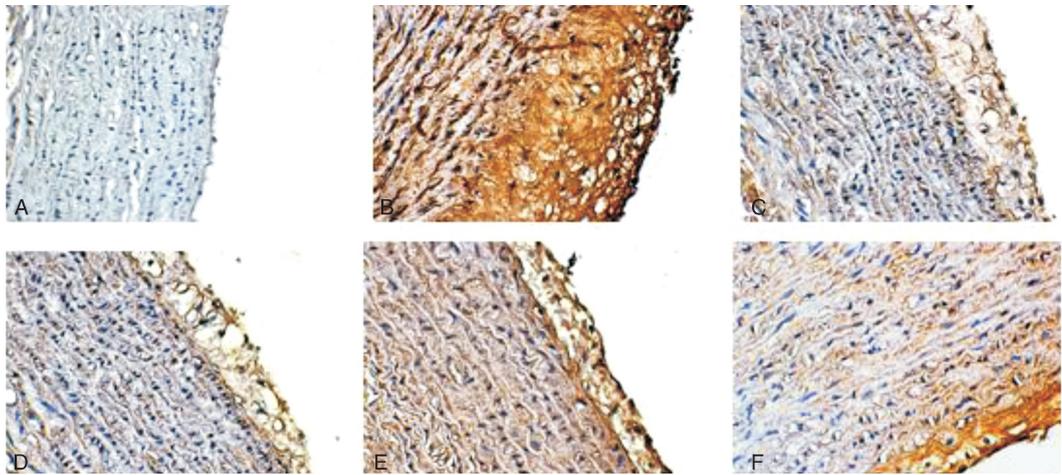


图 2. 兔主动脉管壁 LOX-1 的免疫组织化学染色(400×) A 为空白组, B 为模型组, C 为心痛泰低剂量组, D 为心痛泰中剂量组, E 为心痛泰高剂量组, F 为瑞舒伐他汀组。

Figure 2. Immunohistochemical staining of LOX-1 in rabbit aortic wall(400×)

气滞痰浊血瘀、痰瘀互结于血脉,“痰瘀”的形成与内膜下脂质聚集和炎症反应密切相关^[4]。因此以理气化痰、活血化瘀通络为基本法则对于减轻 As 炎症反应有重要意义。本实验研究采用的中药复方心痛泰具有活血化瘀、理气止痛之功。既往对心痛泰的研究表明,心痛泰具有降低 As 兔动脉内皮氧化型低密度脂蛋白、IL-1 β 表达的作用^[5]。

本研究选择 Lp-PLA₂、IL-6、hs-CRP、LOX-1 作为动脉粥样硬化炎症反应的评估指标。Lp-PLA₂ 存在于血液循环中,主要与血浆低密度脂蛋白结合,能刺激炎症因子和黏附分子,促进泡沫细胞形成,在斑块形成的动脉中 Lp-PLA₂ 水平明显升高,它与其他引起 As 的炎性介质,如 hs-CRP、IL-6、低密度脂蛋白等呈正相关,与冠状动脉病变的严重程度密切相关^[6-7]。hs-CRP 和 IL-6 是急性时相反应蛋白,是反映体内急性炎症和组织损伤的重要标志物^[8],参与动脉粥样硬化的形成和不稳定斑块的破裂过程,与冠心病的发生、发展及预后密切相关。LOX-1 主要表达于动脉粥样硬化病变的巨噬细胞、平滑肌细胞和泡沫细胞,LOX-1 可被多种因素激活,导致炎症因子的产生和释放,加速巨噬细胞泡沫化和平滑肌细胞增殖,促进动脉粥样硬化的发生^[9-10]。

本实验结果表明,心痛泰可降低 As 模型兔 Lp-PLA₂、IL-6、CRP、LOX-1 的含量,证实了心痛泰可通过减轻 As 炎症反应来治疗动脉粥样硬化。

[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, 2001: 87.

[2] 刘明玥,王帅,吴崇明,等. 动脉粥样硬化药理模型概述[J]. 国际药学研究杂志, 2015, 42(1): 25-29.

[3] 易琼,郭志华,李雅,等. 心痛泰对动脉硬化兔主动脉 NF- κ B、p65、TNF- α 、IL-10 的影响[J]. 中医药导报, 2016, 22(6): 32-36.

[4] 任建勋,李磊,林成仁,等. 痰瘀同治方对小型猪冠状动脉粥样硬化炎症反应的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(2): 285-290.

[5] 易琼,李雅,郭志华,等. 心痛泰对动脉粥样硬化兔血脂及主动脉 ox-LDL、IL-1 β 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(1): 39-43.

[6] Kolasa-Trela R, Fil K, Bazanek M, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 is elevated in patients with severe aortic valve stenosis without clinically overt atherosclerosis [J]. Clin Chem Lab Med, 2012, 50(10): 1 825-831.

[7] 罗艳婷,彭隆,董睿敏,等. 脂蛋白相关磷脂酶 A2 水平与冠状动脉病变的关系研究[J]. 中华临床医师杂志(电子版), 2015, 9(9): 1 520-524.

[8] Kiefer CR, Stock RE, Flanagan SS, et al. Early verification of myocardial ischemia with a novel bio-marker of acute tissue damage: C-reactive protein fractional forms[J]. Clin Chim Acta, 2012, 413(19-20): 1 536-541.

[9] 冉小丽,吴芹,石京山,等. 凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 在动脉粥样硬化中的作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(5): 865-871.

[10] Zhang Z, Zhang M, Li Y, et al. Simvastatin inhibits the additive activation of ERK1/2 and proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by combined mechanical stress and ox-LDL through LOX-1 pathway [J]. Cell Signal, 2013, 25(1): 332-340.

(此文编辑 曾学清)