

额尔敦-乌日勒在家兔动脉粥样硬化 斑块消退中的作用及其对炎症因子的影响*

□麻春杰** 董 平 韩雪梅 王 滨 图门巴雅尔

李志茹 温都苏毕力格 都格尔

(内蒙古医学院 呼和浩特 010110)

摘 要:目的:观察额尔敦-乌日勒对动脉粥样硬化消退的影响,并检测相关炎症因子,探讨其作用机制。方法:用高胆固醇喂养方法复制家兔动脉粥样硬化模型,并予额尔敦-乌日勒干预治疗 12w。于实验结束时检测血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和血清中炎症标志物高敏 C 反应蛋白(hs-PCR)含量,以及血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)的水平;观察各组家兔主动脉动脉粥样硬化情况;检测主动脉中 VCAM-1 mRNA 表达水平。结果:与自然消退组比较,额尔敦-乌日勒治疗组的血清 TC、TG、LDL-C 水平降低,HDL-C 变化不明显;主动脉斑块面积占总面积的百分比及内膜/中膜厚度比减小;血清中 hs-PCR 含量和 VCAM-1 水平降低,主动脉 VCAM-1 mRNA 表达水平下降。结论:额尔敦-乌日勒对早期动脉粥样硬化具有消退作用,其机制可能与降脂、抗炎有关。

关键词:额尔敦-乌日勒 动脉粥样硬化 病理学 高敏 C 反应蛋白 血管细胞粘附分子-1

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.05.030

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, As)是心脑血管疾病的主要病理基础。研究表明,早期 As 是可逆的,在一定条件下,可延缓或停止发展甚至逐渐消退。前期研究表明传统蒙药额尔敦-乌日勒能够有效干预动脉粥样硬化的形成和发展^[1],但其是否能够减少、消退 As 早期斑块尚未见文献报道。本研究利用实验性 As 动物模型,通过给药治疗,观察额尔敦-乌日勒对动脉粥样硬化的消退作用,并探讨其作用机制。

一、材料与方法

1. 材 料

(1)药物与试剂。

额尔敦-乌日勒由内蒙古蒙药股份有限公司生产,批号:100336,应用时以蒸馏水溶解;阳性对照药辛伐他汀(Sinvastatin)片由山东罗欣药业股份有限公司生产,批号:090723,蒸馏水溶解;胆固醇由北京爱普华美生物科技有限公司生产,批号:20090715;蛋黄粉由北京金健力蛋粉厂生产;猪油:市售;总胆固醇(Total cholesterol, TC),甘油三酯(Triglyceride, TG),

收稿日期:2011-04-18

修回日期:2011-05-17

* 国家自然科学基金委地区科学基金项目(30860386):蒙药额尔敦-乌日勒抗动脉粥样硬化的分子机制研究,负责人:麻春杰。

** 通讯作者:麻春杰,教授,主要研究方向:中蒙药防治心脑血管疾病,E-mail:mcj2007@yahoo.com.cn。

低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C), 高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂盒为中生北控生物科技股份有限公司产品, 批号分别是 2400136、2400135、2400732、2400024。ELISA 法超敏 C 反应蛋白(High sensitivity C reactive protein, hs-CRP)以及血管细胞粘附分子-1(Vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供, 批号分别是 BPE20725Rb 和 BPE61116Rb。RNA 提取试剂盒、反转录(RT)试剂盒以及实时定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒均购于南京凯基生物科技发展有限公司。

(2) 动物。

健康家兔, 雄性, 体重(2.0 ± 0.2)kg, 由北京大学医学部实验动物科学部提供, 许可证编号: SCXK(京)2005-0002, 实验在内蒙古医学院实验动物中心完成。

(3) 仪器与设备。

意大利 PRONTO-E(奔腾加强型)全自动生化分析仪、TDL-5-A 离心机、TGL-16G 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂制造)、MOTIC AE20 生物显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司生产)、高清晰彩色医学图文分析系统、2400 型 PCR 扩增仪(PERKINELMER)、ABI Prism 7300 型实时荧光定量(PCR)仪(Applied Biosystems, USA)等。

2. 方 法

(1) 动脉粥样硬化动物模型的建立。

取雄性家兔 60 只, 在室温 $18^{\circ}\text{C} \sim 22^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 35%~55% 的实验环境下喂饲 1w 后, 其中 10 只为正常对照组, 每只兔喂饲普通饲料 $150 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$, 其余 50 只采用高脂饮食造模, 每只兔喂饲高脂饲料(胆固醇 1.5%、猪油 5%、蛋黄粉 10%、基础饲料 83.5%) $50 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$, 待高脂饲料食尽后补充普通饲料 $100 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$, 自由饮水。连续喂养 12w 后确定家兔已形成早期 As(肉眼可见脂质斑块, 光镜可见大量泡沫细胞等)。

(2) 动脉粥样硬化斑块的消退治疗。

将动脉粥样硬化模型家兔随机分成 5 组: 自然消退组; 额尔敦-乌日勒高、中、低剂量组, 分别灌服额尔敦-乌日勒 0.4 、 0.2 、 $0.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 辛伐他汀组, 灌服辛伐他汀 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 正常对照组与自然消退组分别灌服同体积的蒸馏水, 给药容量均为 $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每日 1 次。自给药第 1 天起, 所有兔喂饲普通饲料, 连续给药 12w 后将动物取血后处死。

(3) 血脂和高敏 C 反应蛋白、血管细胞粘附分子-1 的测定。

分离血清, 应用全自动生化仪检测 TC、TG、HDL-C、LDL-C 含量; 采用 ELISA 法检测血清中 hs-CRP 含量和 VCAM-1 水平。

(4) 病理学检查。

动物处死后, 取主动脉弓下约 1cm 用 10% 中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋、切片、HE 染色, 进行病理形态学观察, 采用高清晰彩色医学图文分析系统定量分析切片主动脉内膜厚度(Intimal thickness, I)、中膜厚度(Medial thickness, M), 并计算 I/M。剩余主动脉部分用 15% 中性甲醛溶液固定后, 按文献方法^[2]用“油红 O”染色、观察, 测算斑块面积占主动脉总面积之百分比。

(5) 主动脉 VCAM-1 mRNA 表达的测定。

采用 RNA 提取试剂盒提取主动脉中 RNA, 逆转录 cDNA 后采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)的方法测定主动脉中 VCAM-1 mRNA 的表达, 扩增以磷酸甘油醛脱氢酶(Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因 mRNA 作为内参照, 引物序列由上海生工生物技术有限公司合成。GAPDH 引物序列为上游 $5' - \text{tttaactctggc} \text{aaagtgatgt} \text{t} - 3'$, 下游 $5' - \text{acttgccgtgggtggaatc} - 3'$; VCAM-1 引物序列为上游 $5' - \text{gatgattgcagcttctcaagctt} - 3'$, 下游 $5' - \text{gatgattgcagcttctcaagctt} - 3'$ 。Real-time PCR 反应体系为 $20 \mu\text{L}$ 。反应条件: 95°C 预变性 10s, 然后是 40 次循环。每次循环条件: 95°C 变性 5s, 60°C 退火、延伸 31s, 每个样本重复 3 次。利用 Real-time PCR 仪数据分析软件(SDS, Version 1.3, TaqMan)得出 VCAM-1 和 GAPDH 的 CT 值。以 GAPDH 为内对照, 自然消退组与给药各组 VCAM-1 基因的表达水平相对于正常组的变化倍数为 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 倍。采用 $2^{-\Delta\text{CT}}$ 法对 VCAM-1 基因的表达水平进行相对定量, 并进行统计学分析。实验特异性经融解曲线分析判断。

(6) 统计学分析。

采用 SPSS13.0 软件包进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数间差异采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结 果

1. 一般体征变化

实验期间家兔健康状况良好, 其中造模期间(0~

12w)有4只家兔因感冒、腹泻等原因死亡;为确定模型成功处死2只;给药治疗后(13~24w)有5只死亡,死亡原因同前。其余家兔精神状态、行为活动、毛色、饮水、粪便未见明显异常,体重增长速度组间无差异。

2. 血脂水平的变化

检测0、12、24w血脂水平的变化,喂高脂饲料12w各组家兔血脂水平升高,停喂高脂饲料24w时血脂均下降,但仍未恢复正常血脂水平。给药的辛伐他汀组及额尔敦-乌日勒高(中)剂量组血清TC、TG、LDL-C显著低于自然消退组($P<0.05$),而HDL-C变化不明显。见表1。

3. 主动脉病理形态学观察

将主动脉用油红O染色后,进行图像分析,额尔敦-乌日勒高、中剂量组和辛伐他汀组的主动脉斑块面积占主动脉总面积百分比较自然消退组减少($P<0.05$),结果见表2。

主动脉光镜观察如图1所示。正常组家兔动脉壁结构正常;各造模组家兔主动脉壁有不同程度隆起,内膜明显增厚,内含泡沫细胞,有的可见胆固醇结晶,中膜平滑肌细胞排列紊乱;自然消退组病变程度较重,而给药各组(额尔敦-乌日勒低剂量组除外)均比自然消退组斑块厚度减小,泡沫细胞层数明显减少。主动脉内膜及中膜厚度比值结果见表3。

4. 血清hs-PCR含量和VCAM-1水平比较

正常组血清hs-CRP含量和VCAM-1水平较低,造模各组hs-CRP和VCAM-1显著升高,而辛伐他汀组和额尔敦-乌日勒高中剂量组比自然消退组显著降低,结果见表4。

5. 对主动脉血管细胞粘附分子-1 mRNA表达的影响

正常对照组家兔主动脉有少量VCAM-1表达,曾喂饲高脂饲料各组VCAM-1有大量表达,显著高

于正常组(表达量1.0)($P<0.01$),其中自然消退组最为显著,是正常组的5.81倍,而给予额尔敦-乌日勒

表1 各组家兔血脂水平变化($\bar{x}\pm s$, mmol·L⁻¹)

组别	时间(w)	n	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常对照组	0	10	1.30±0.30	0.79±0.26	0.96±0.32	0.23±0.14
	12	9	1.23±0.32 ^{▲▲}	0.84±0.19 ^{▲▲}	0.87±0.38 ^{▲▲}	0.25±0.17 ^{▲▲}
	24	8	1.35±0.36 ^{▲▲}	0.71±0.22 ^{▲▲}	1.01±0.23 ^{▲▲}	0.28±0.22 ^{▲▲}
自然消退组	0	10	1.41±0.29	0.68±0.36	0.95±0.27	0.31±0.19
	12	9	32.5±5.18	3.45±0.58	13.58±2.31	0.63±0.16
	24	7	11.8±2.19	1.62±0.22	3.11±0.88	0.32±0.12
辛伐他汀组	0	10	1.35±0.22	0.62±0.18	0.99±0.33	0.28±0.35
	12	9	31.5±6.13	3.57±0.32	14.23±1.95	0.71±0.33
	24	9	5.67±2.31 [▲]	1.11±0.25 [▲]	2.11±0.68 [▲]	0.35±0.24
额-高剂量组	0	10	1.28±0.30	0.58±0.27	0.92±0.37	0.32±0.16
	12	9	31.99±5.88	3.62±0.35	13.61±2.01	0.72±0.21
	24	8	6.33±2.31 [▲]	0.98±0.52 [▲]	2.32±0.59 [▲]	0.31±0.30
额-中剂量组	0	10	1.35±0.35	0.63±0.34	0.89±0.36	0.31±0.20
	12	9	30.87±6.11	3.51±0.57	14.12±1.99	0.69±0.32
	24	9	7.19±1.90 [▲]	1.22±0.32	2.36±0.78 [▲]	0.36±0.37
额-低剂量组	0	10	1.40±0.24	0.58±0.17	0.88±0.29	0.29±0.30
	12	9	31.76±5.83	3.65±0.53	13.35±2.33	0.69±0.25
	24	8	8.65±3.11	1.55±0.33	2.96±2.33	0.29±0.55

注:与自然消退组同时刻比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

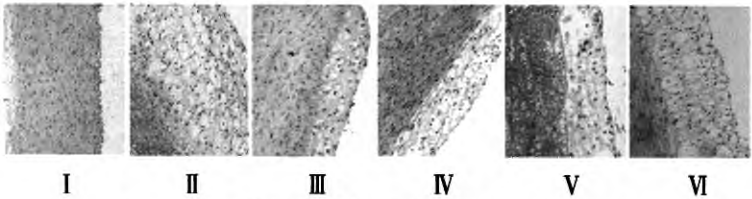


图1 各组家兔主动脉HE染色结果比较(×100)

注:I正常对照组,II模型对照组,III辛伐他汀组,IV额-高剂量组,V额-中剂量组,VI额-低剂量组。

表2 各组家兔主动脉油红O染色后图像分析结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量(mg·kg ⁻¹)	斑块面积占总面积比(%)
正常对照组	8	-	0
自然消退组	7	-	53.52±11.68
辛伐他汀组	9	5.0	36.35±10.12 [▲]
额-高剂量组	8	400	38.11±9.26 [▲]
额-中剂量组	9	200	40.89±10.01 [▲]
额-低剂量组	8	100	42.79±9.96

注:与自然消退组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

治疗的高、中剂量组能减少高脂饲料诱导的兔主动脉 VCAM-1 mRNA 的表达($P<0.05$),分别是正常组的 2.73 倍、3.48 倍。辛伐他汀同样减少 VCAM-1 mRNA 表达($P<0.05$),是正常对照组的 2.23 倍。而低剂量组 VCAM-1 mRNA 表达量是正常组的 4.61 倍,与自然消退组比较无明显差异($P>0.05$)。各组家兔主动脉 VCAM-1 相对表达量比较见图 2。

三、讨论

动脉粥样硬化所导致的冠心病、脑中风等疾病,具有发病率高、致残率高、死亡率高、复发率高等特点,已成为危害人类健康的“头号杀手”。加强对 As 的防治是降低心脑血管发病率及死亡率的关键。采取有效措施预防、延缓 As 的发生发展,消退、稳定斑块,减少临床事件,以及发现、开发多靶点疗效好的药物是医药工作者面临的挑战。额尔敦-乌日勒(珍宝丸)是蒙医在临床治疗“白脉病”(类似于脑出血、脑血栓、神经损伤、神经根炎等脑神经系统疾病)、“协日乌素”(风湿、类风湿等病)的常用蒙成药,由珍珠、石膏、丁香、红花、土木香、木香、檀香、地锦草、水牛角、苘麻子、白苣胜等 29 味纯天然药材组成。作为地域性知名药种,额尔敦-乌日勒以其组方主从关系严谨,用药量少,药力独到,疗效卓著的特点,在当地具有“神药”之称^[3]。近些年对额尔敦-乌日勒的研究逐步深入,临床研究表明其治疗心脑血管疾病疗效显著^[4-6]。

从实验结果可以看出,经过的高脂饲料喂饲,家兔血脂水平显著升高,可形成明显的早期 As 斑块。再通过的给药治疗,与自然消退组比较,额尔敦-乌日勒能够降低 As 家兔血清中 TC、TG、LDL-C,明显减少斑块面积、斑块厚度和泡沫细胞层数,表明额尔敦-乌日勒对 As 斑块具有一定的消退作用。特别是高剂量组显示出较好的效果,而中低剂量组效果不明显,表明额尔敦-乌日勒的给药有效剂量亦是斑块消退的关键,存在剂量依赖性。

C 反应蛋白(CRP)和 VCAM-1 是公认的炎症标志物,在炎症反应时明显升高,而且与 As 和冠心病关系密切;hs-CRP 作为体内炎症反应的敏感指标,可直接反应 As 的发生及严重程度,是 As 血栓形成疾病的介导和标志物,它参与了 As 形成的全过程。其水平的高低是预测心脑血管疾病危险性的一项独立危险因素^[7-8]。同时,CRP 可诱导 VCAM-1 的表达。

VCAM-1 在 As 病变形成早期主要是促使单核细胞向内皮黏附和迁移,且参与了 As 形成过程中平滑肌细胞的迁移和增殖^[9]。研究结果显示,给予额尔敦-乌日勒治疗能够减少 As 家兔血清中 hs-CRP 含量与 VCAM-1 水平,并能降低主动脉 VCAM-1 的表达,表明额尔敦-乌日勒可通过减轻炎症反应降低动脉粥样硬化的严重程度,抑制单核细胞的迁移和聚集,干扰巨噬细胞来源的泡沫细胞的形成,从而起到抑制粥样病变的形成、发展和消退斑块的作用。

总之,额尔敦-乌日勒具有消退早期动脉粥样硬化的作用,可能通过降脂、抗炎等途径发挥作用。

表 3 各组家兔主动脉内膜及中膜厚度比($\bar{x}\pm s$)

组别	n	剂量 (mg·kg ⁻¹)	I (μm)	I/M
正常对照组	8	—	10.12±0.12 [▲]	0.01±0.01 [▲]
自然消退组	7	—	653.52±2.78	1.31±0.12
辛伐他汀组	9	5.0	495.63±4.55 [▲]	0.77±0.42 [▲]
额-高剂量组	8	400	474.45±4.58 [▲]	0.72±0.32 [▲]
额-中剂量组	9	200	512.30±4.82 [▲]	0.99±0.32 [▲]
额-低剂量组	8	100	554.08±5.18	1.22±0.14

注:与自然消退组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

表 4 各组家兔血清 hs-CRP 与 VCAM-1 比较

组别	n	剂量 (mg·kg ⁻¹)	hs-CRP (μg·L ⁻¹)	VCAM-1 (μg·L ⁻¹)
正常对照组	8	—	1.36±0.96 [▲]	5.7±2.28 [▲]
自然消退组	7	—	8.76±3.17	122.7±27.05
辛伐他汀组	9	5.0	3.12±1.00 [▲]	43.75±18.69 [▲]
额-高剂量组	8	400	4.24±1.49 [▲]	70.65±17.83 [▲]
额-高剂量组	9	200	6.38±1.67 [▲]	85.05±24.24 [▲]
额-低剂量组	8	100	8.59±1.27	126.7±21.96

注:与自然消退组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

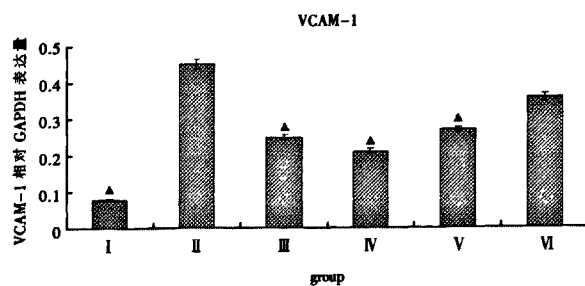


图 2 各组家兔主动脉 VCAM-1 相对表达量比较

注:与自然消退组比较▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$; I—正常组, II—自然消退组, III—辛伐他汀组, IV、V、VI—额尔敦-乌日勒高、中、低剂量组。

参考文献

- 董平,麻春杰,温都苏毕力格,等. 额尔敦-乌日勒对实验性家兔动脉粥样硬化的影响. 中华中医药学刊,2011,29(5):1012~1015.
- 张顺民,龚志锦,陈伟红,等. 实验动物整体血管和心脏冰冻切片的脂质染色法改进与应用. 中国组织化学与细胞化学杂志,2004,13(1):127.
- 李志起. 从蒙药珍宝丸的成功看处方药如何突围. 中国医药导报,2006,3(22):82~83.
- 边小华. 治疗萨病的体会. 中国蒙医药,2010,(1):53.
- 那仁满都拉,斯庆. 治疗心悸的体会. 中国蒙医药,2010,(3):10.
- 查干夫,塔娜. 脑梗治验. 中国蒙医药,2010,(5):38.
- Ridker P M, Hennekens C H, Buring J E, *et al.* C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med*, 2000, 342:836~843.
- Rost NS, Wolf PA, Kase CS, *et al.* Plasma concentration of C-reactive protein and risk of ischemic stroke and transient ischemic attack: the Framingham study. *Stroke*, 2001, 32(11):2575~2579.
- Doran A C, Meller N, McNamara C A. Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2008, 28:812~819.

Effect of Eerdun-Wurili on Rabbit Atherosclerosis Recession and Inflammation Factors

Ma Chunjie, Dong Ping, Han Xuemei, Wang Bin, Tumen Bayaer, Li Zhiru, Wendusu Bilige, Dugeer
(Inner Mongolia Medical College, Huhhot 010110, China)

Abstract: The study is aimed to observe the effect of Eerdun-wurili on atherosclerosis recession. Related inflammation factors were detected in the mechanism discussion. High cholesterol feeding method was used in the rabbit atherosclerosis model establishment. Eerdun-wurili was used in a 12-week treatment. Content of serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and serum inflammatory markers hypersensitive C-reactive protein (hs-PCR) were detected after the experiment. Level of vascular cellular adhesive molecular-1 (VCAM-1) was also tested. The aortic atherosclerosis severity was observed. The VCAM-1 mRNA expression level in the aorta was also observed. The results showed that compared with natural recession group, level of serum TC, TG, LDL-C in the treatment group were reduced. The content change of HDL-C was not significant. The percentage of aortic plaque area in total area and the ratio between inner-membrane and tunica media were also decreased. Serum hs-PCR content and VCAM-1 level were reduced. VCAM-1 mRNA aortic expression level was also declined. It is concluded that Eerdun-wurili plays a recession role in early atherosclerosis. Its mechanism may be related to cholesterol-lowering and anti-inflammation.

Keywords: Eerdun-wurili, atherosclerosis, pathology, hypersensitive C-reactive protein, vascular cellular adhesive molecular-1

(责任编辑:李沙沙,责任译审:王 晶)