

四妙勇安汤抑制动脉粥样硬化易损斑块炎症反应机制

许颖智¹, 张军平², 李明², 李良军¹, 彭立¹, 张光银¹, 杨萃¹, 周亚男¹

1. 天津中医药大学研究生院, 天津 300193
2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

摘要 通过利用复合因素制备兔动脉粥样硬化(AS)易损斑块模型,研究四妙勇安汤对AS易损斑块的影响及作用机制。随机将40只日本大耳白兔分为正常组10只,实验组30只。正常组予普通饲料,实验组利用复合因素制备兔主AS易损斑块模型,8周时实验组随机分为模型组、辛伐组、四妙组,继续予以高脂饮食;各给药组开始给药至24周取材,观察主动脉的病理形态,检测血清MCP-1、ICAM-1、CRP含量和斑块内HSP60、TNF- α 、NF- κ B表达。结果显示,模型组内膜明显增厚、纤维帽较薄,斑块内有大量脂质沉积和炎症细胞浸润,血清MCP-1、ICAM-1、CRP随时间延长呈上升趋势,主动脉斑块TNF- α 、HSP60、NF- κ B表达增加。在给药后各时间点四妙组血清MCP-1、ICAM-1水平均低于模型组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),对CRP水平影响不明显。斑块内TNF- α 、HSP60、NF- κ B阳性面积百分比均低于模型组($P < 0.01$),ICAM-1 mRNA表达低于模型组($P < 0.01$)。由此得出,四妙勇安汤能够稳定AS易损斑块,其作用可能是通过抑制炎症反应实现的。

关键词 动脉粥样硬化易损斑块;四妙勇安汤;炎症反应

中图分类号 R25

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)23-0095-04

Effect of Simiaoyong'an Decoction on Inflammation Reaction in Rabbit's Atherosclerosis Vulnerable Plaque

XU Yingzhi¹, ZHANG Junping², LI Ming², LI Liangjun¹, PENG Li¹, ZHANG Guangyin¹, YANG Cui¹, ZHOU Yanan¹

1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
2. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract The purpose of this study is to observe the effect of Simiaoyong'an Decoction (SYD) on Atherosclerosis (AS) vulnerable plaque. 40 Japanese white rabbits were randomly assigned to two groups: 10 in the normal control group, and 30 in the experimental group to be established as the AS model by high fatty diet feeding, combined with immune injury at the 2nd week and femoral arterial balloon tearing at the 4th week. At the 8th week, 30 rabbits in the experimental group were randomly assigned to four groups: each 10 in the model group, the SYD group and the simvastatin group. The medication of SYD and simvastatin were given in the whole 16-week course. Levels of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), and intercellular adhesion molecule (ICAM-1) and CRP were measured at the 8th, 16th and 24th weekend in experiment. The tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and the nuclear factor-kappa B (NF- κ B), HSP60 expression in aortic wall were measured at the end of experiment. The results show that compared with the model group, the levels of MCP-1, ICAM-1 are lower in the two treated groups at all time points after treatment ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). TNF- α , NF- κ B and HSP60 expression in aortic wall are lower after treatment ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). In overall, it is demonstrated that SYD could stabilize atherosclerosis vulnerable plaque by suppressing the inflammation reaction.

Keywords AS vulnerable plaque; Simiaoyong'an Decoction; inflammation reaction

收稿日期: 2010-09-22; 修回日期: 2010-11-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30901890)

作者简介: 许颖智, 博士研究生, 研究方向为中西医结合治疗心血管疾病, 电子信箱: xufanyingzhi@163.com; 张军平(通信作者), 教授, 研究方向为中西医结合治疗心血管疾病, 电子信箱: tjzhtcm@163.com

0 引言

动脉粥样硬化(AS)疾患随着生活方式的改变其发病率呈逐年上升趋势,导致各种心脑血管疾病的发生,严重危害人类健康。在AS病理机制的认识上,1999年Ross在内皮损伤反应学说基础上提出的AS是一种炎症性疾病被广泛接受^[1]。而AS斑块炎症的产生与NF- κ B的激活有关,被激活后引发一系列级联反应,可调控多种基因表达^[2-3],在AS的发生发展过程中起到非常重要的作用,是促进斑块不稳定的关键因素。炎症反应可通过增加斑块内坏死脂核,促进斑块内促血管新生因子的过表达,增强斑块内基质金属蛋白酶的活性,加速基质降解等多种途径导致斑块易损性增加。近年中药在防治AS疾病过程中呈现良好效果,在临床治疗中加入清热解毒药后往往收效极佳^[4-5]。彭立等^[6]认为AS疾病乃阴虚毒瘀为主要病机,治疗以滋阴解毒活血为治疗大法,并且将其法用于治疗冠心病,效果甚佳。本研究依据中医理论和临床实践,将其一治疗外科疾病的名古方引入冠心病领域,以免AS易损斑块为模型,从炎症反应的角度探寻其稳定AS晚期易损斑块的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物

辛伐他汀:40 mg/片,5片/盒,批号:07283,杭州默沙东制药有限公司;四妙勇安汤煎剂:金银花30g、玄参30g、当归20g、甘草10g,汤液经旋蒸仪旋蒸浓缩至含生药2.25g/mL。

1.1.2 试剂

NF- κ B免疫组化一抗(Rel A,Cat.#RB-1638-P0,rabbit polyclonal antibody,Thermo);TNF- α 免一抗(BA0131,rabbit polyclonal antibody,武汉博士德有限公司);HSP60(BM1511,rabbit polyclonal antibody,武汉博士德公司),CD68一抗(Ab-3,mouse monoclonal antibody,Cat.#MS-397-P0,Thermo);MCP-1、ICAM-1、CRP ELISA试剂盒(美国RB公司)。

1.1.3 仪器

酶标仪(MK3,Thermo),电泳仪(DYY-8C,北京六一仪器厂),PCR仪(TC-96,杭州博日科技有限公司),紫外透射仪(UV-254,北京鼎国生物技术发展中心),生物显微镜(Olympus-BX40,日本Olympus公司),高清晰度彩色病理图像分析系统(HMIAS-2000,武汉同济医科大学千屏影像工程公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组及给药方法

选用普通级雄性日本大耳白兔40只,体重(2.2 \pm 0.2)kg,由北京市维通利华实验动物中心提供。随机分正常组10只,实验组30只。所有动物均单笼饲养,饮水不限,自由摄食,每日每只予150g饲料,喂养24周;正常组动物予普通饲料,实验组动物予高脂饲料。采用高脂饮食加免疫损伤和球囊拉伤方法建立兔AS斑块模型^[7],自8周时实验组随机分为模型组、辛伐他汀组、四妙勇安组(简称为模型组、辛伐组、四妙

组)。各给药组开始给药至24周取材,给药量按动物与人用药量体表面积折算系数15换算。辛伐他汀5mg/(kg·次),1次/日;四妙勇安汤按生药量11.25g/(kg·次),2次/日;模型组予蒸馏水10mL/次,2次/日。

1.2.2 标本的收集

分别于实验开始、给药第8周、第16周、第24周采血。每次采血前禁食12h,经耳缘静脉抽血3mL,静置1h后3000 r/min离心10min,提取血清置于-80℃冰箱冻存备用;24周取材,用3%戊巴比妥钠(30mg·mL⁻¹·kg⁻¹)麻醉后将动物固定于手术台,取出主动脉血管组织,沿纵轴剪开,用生理盐水轻轻冲洗后一部分置于组织冻存管,液氮保存,做PCR测试备用;一部分置于10%中性福尔马林固定。

1.2.3 标本测定

石蜡包埋,苏木素-伊红(HE)、油红“O”、Masson染色,光镜观察病理改变。MCP-1、ICAM-1、CRP含量测定采用ELISA方法,斑块内HSP60、TNF- α 、NF- κ B表达,采用免疫组化方法,分析测量各阳性染色面积占整个场面积的百分比。每张切片随机观察5个不同的高倍镜视野(10 \times 40),计算阳性细胞(细胞内有黄褐色或棕黄色沉淀物)的面积与整个场面积的比率,取其平均值。ICAM-1 mRNA表达采用RT-PCR方法检测,测定ICAM-1 mRNA的相对表达量。

1.2.4 统计方法

实验数据计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(SPSS 11.5软件),差异显著性水平设为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 四妙勇安汤对血清炎症因子的影响

第8周即给药前模型组血清炎症因子ICAM-1、MCP-1、CRP水平均远远高于正常组($P<0.01$)。第16、24周四妙组ICAM-1、MCP-1水平明显低于模型组($P<0.01$, $P<0.05$);CRP水平与模型组相当,无统计学意义(表1)。可见,四妙勇安汤可在一定程度上降低AS模型兔机体的ICAM-1和MCP-1水平,对血清CRP含量无明显影响。

2.2 四妙勇安汤对病理形态学的影响

由图1可以看出,正常组主动脉内皮细胞完整,单层紧贴内弹力板,中层平滑肌细胞排列整齐,呈长椭圆形。模型组主动脉见有典型粥样斑块形成,斑块表面有纤维组织覆盖,形成典型的“纤维帽”,且纤维帽较薄;内膜明显增厚,内皮部分脱落、不完整,内皮下见脂质浸润,大量泡沫细胞及炎性细胞浸润,弹力板不连续,弹力纤维断裂溶解,有大量胶原纤维生成。辛伐组内膜增厚,有少量泡沫细胞形成,内皮完整,中膜平滑肌增殖,部分向内膜移行,弹力板尚完整。四妙组内膜增厚,可见若干泡沫细胞,内皮完整,中膜平滑肌增殖,排列尚规则,弹力板尚完整。

2.3 四妙勇安汤对斑块内炎症反应的影响

正常组动脉壁有少量NF- κ B表达,模型组HSP60、TNF- α 、NF- κ B蛋白呈强阳性表达,其阳性面积百分比均明显高于正

表 1 第 8 周、第 16 和第 24 周各组 ICAM-1、MCP-1 水平比较
Table 1 The levels of ICAM-1, MCP-1, CRP in serum at the 8th, 16th and 24th week

时点	组别	只数	ICAM-1 含量/(ng·mL ⁻¹)	MCP-1 含量/(pg·mL ⁻¹)	CRP 含量/(pg·mL ⁻¹)
第 8 周	正常组	10	341.70±16.99	72.25±28.05	17.86±0.97
	模型组	8	462.83±42.51*	240.91±102.05*	20.45±2.17*
第 16 周	模型组	8	583.85±45.47 [▲]	240.70±88.04	27.43±3.67
	辛伐组	10	509.46±44.05 [▲]	219.97±80.20	28.74±1.29
	四妙组	10	522.72±46.22 [▲]	162.06±66.75 [△]	26.19±1.78
第 24 周	模型组	8	678.96±64.12 [▲]	307.91±131.10	35.30±4.71
	辛伐组	10	582.59±34.53 [▲]	145.64±24.93 [△]	32.40±3.93
	四妙组	10	457.83±48.22 [▲]	111.89±57.86 [▲]	32.91±1.60

注: 与正常组比较, ★表示 $P<0.05$, *表示 $P<0.01$; 与模型组比较, △表示 $P<0.05$, ▲表示 $P<0.01$ 。

Notes: compared with normal group, ★means $P<0.05$, *means $P<0.01$; compared with normal group, △means $P<0.05$, ▲means $P<0.01$.

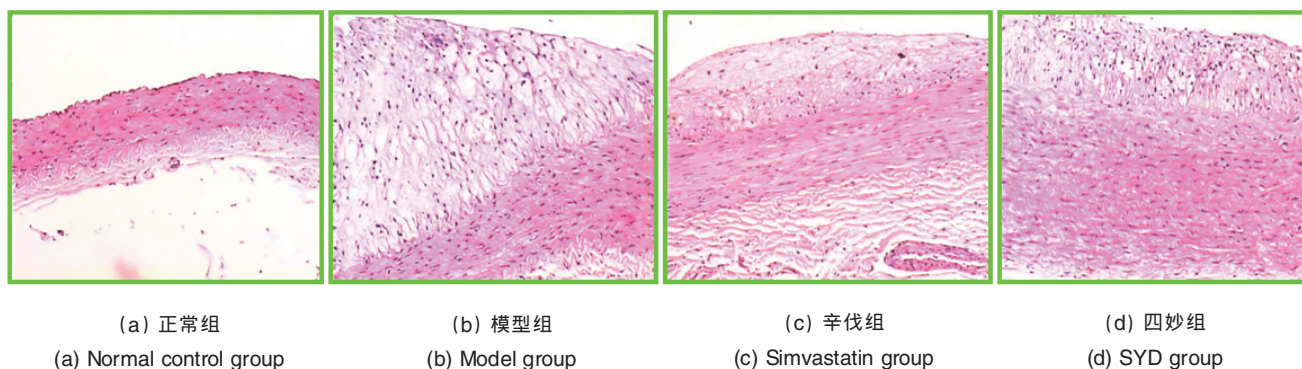


图 1 各组 HE 染色观察比较 (40×)
Fig. 1 Comparison of 4 groups in HE staining (40×)

常组 ($P<0.01$), AS 斑块内存在一定的炎症反应; 四妙组 HSP60、TNF- α 、NF- κ B 阳性面积百分比均低于模型组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 可见四妙勇安汤可能能够抑制 HSP60、TNF- α 、NF- κ B 蛋白表达, 抑制斑块内炎症反应 (表 2)。

表 2 各组 HSP60、TNF- α 、NF- κ B 阳性面积百分比比较

Table 2 Comparison of HSP60, TNF- α , NF- κ B expression in plaque of 4 groups

组别	只数	HSP60	TNF- α	NF- κ B
正常组	10	1.37±0.567	2.38±0.83	0.17±0.07
模型组	8	26.96±9.42* [▲]	28.93±7.08*	24.38±8.10*
辛伐组	10	8.99±1.343* [▲]	9.24±2.98* [▲]	12.00±2.56* [△]
四妙组	10	9.82±3.763* [▲]	9.88±2.73* [▲]	11.63±3.83* [△]

注: 与正常组比较, ★表示 $P<0.05$, *表示 $P<0.01$; 与模型组比较, △表示 $P<0.05$, ▲表示 $P<0.01$ 。

Notes: compared with normal group, ★means $P<0.05$, *means $P<0.01$; compared with normal group, △means $P<0.05$, ▲means $P<0.01$.

2.4 四妙勇安汤对 AS 斑块内 ICAM-1 mRNA 表达的影响

由表 3 可知, 以 ICAM-1 mRNA/Actin 比值表示 ICAM-1 mRNA 基因的相对表达量。模型组 ICAM-1 mRNA 相对表达高于正常组; 四妙勇安汤组和辛伐他汀组 ICAM-1 mRNA 表达均低于模型组 ($P<0.01$), 但四妙勇安汤组和辛伐他汀组之

表 3 各组 ICAM-1 mRNA 表达的比较

Table 3 Comparison of ICAM-1 mRNA expression in plaque of 4 groups

组别	只数	ICAM-1 mRNA/Actin
正常组	10	1.20±0.35
模型组	8	2.31±0.49* [▲]
辛伐组	10	0.70±0.34* [▲]
四妙组	10	0.61±0.30* [▲]

注: 与正常组比较, *表示 $P<0.01$; 与模型组比较, ▲表示 $P<0.01$ 。

Notes: compared with normal group, *means $P<0.01$; compared with normal group, ▲means $P<0.01$.

间无统计学差异。可见,四妙勇安汤可以从基因水平抑制黏附分子的表达。

3 讨论

在 AS 的发生过程中,各种危险因素可导致内皮损伤,细胞处于一种应激状态就会产生 HSP60,HSP60 可诱导巨噬细胞表达 TNF- α 、基质金属蛋白酶-9,而且它们可以激活血管内皮细胞、平滑肌细胞、单核细胞来源的巨噬细胞,诱导产生 ICAM-1 及 VCAM-1,使血流中的白细胞与内皮细胞相互黏附,继而在单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等趋化因子的作用下迁移至血管内膜;MCP-1 除趋化单核细胞外,对平滑肌细胞也有趋化增殖作用,并诱导组织因子表达,促进局部血栓形成。单核细胞进入内膜后逐渐成熟变为巨噬细胞,活化的巨噬细胞释放 IL-1、IL-8、TNF- α 等细胞因子和生长因子。TNF- α 能够损伤内皮细胞,促进巨噬细胞吞噬脂质,形成泡沫细胞;促进平滑肌增殖及平滑肌源性泡沫细胞的形成;TNF- α 还能够激活转录因子 NF- κ B。NF- κ B 激活后,参与 AS 发生的多种基因表达的调控^[3],可调控许多炎症因子的转录过程,参与 AS 的病理过程,形成炎症级联反应网络。

本实验表明,模型组主动脉见有典型粥样斑块形成,纤维帽较薄,内膜明显增厚,斑块内大量脂质沉积及炎症细胞浸润;血清 ICAM-1、MCP-1、CRP 水平随时间延长呈不断上升趋势;动脉壁斑块内 TNF- α 、HSP60 及 NF- κ B 呈高表达。四妙勇安汤干预后 8 周和 16 周血清 ICAM-1、MCP-1 水平降低,对 CRP 作用不明显。CRP 是急性时相反应蛋白,既往在感染、自身免疫性疾病、肿瘤方面的研究应用较多。近来,CRP 在临床已被广泛应用于预测心血管病变的发生率,CRP 可能是不稳定动脉粥样硬化病变的重要标志物,但并不反映动脉粥样硬化的程度。本实验结果也提示了四妙勇安汤可以抑制内膜厚度、降低斑块易损性,但是对 CRP 的降低作用不明显。免疫组化结果提示其可抑制斑块内 TNF- α 、HSP60 表达,降低斑块内炎症反应水平,抑制炎症相关的细胞信号通路蛋白 NF- κ B 的表达。进一步 PCR 实验表明四妙勇安汤能够抑制 ICAM-1 的 mRNA 表达。四妙勇安汤出自清代包相叔的《验方新编》,其组成简单,由金银花、当归、玄参、甘草四味药组成,金银花清热解毒,当归活血和血,玄参滋阴清热,甘草调和诸药,清热解毒,全方共奏滋阴活血解毒之功效。AS 的发病过程中存在热毒的病理变化,日久脏腑失调,形成血瘀热毒阴虚相互夹杂的病理状态,进而损伤脉络,导致 AS 斑块的形成。四妙勇安汤具有滋阴活血、清热解毒并治之功效,可清除 AS 机体的热毒瘀血,延缓内膜增厚,下调炎症因子表达,抑制炎症反应,从而稳定 AS 易损斑块。

4 结论

四妙勇安汤能够降低内膜厚度,降低血清 MCP-1 和 ICAM-1 水平,对 CRP 水平影响不明显;抑制斑块内 TNF- α 、HSP60 的高表达及炎症细胞信号通路蛋白 NF- κ B 的高表达,

下调 ICAM-1 mRNA 的表达。由此可见,四妙勇安汤能够抑制斑块内炎症反应,降低内膜厚度,抑制斑块生长和斑块内成分的改变,从而稳定 AS 易损斑块,其进一步的作用机制还在深入研究中。

参考文献 (References)

- [1] Ross R. Atherosclerosis—An inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115–126.
- [2] Martin-Ventura J L, Blanco-Colio L M, Munoz-Garcia B, et al. NF- κ pB activation and F as lig and over expression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: Potential implication in plaque instability[J]. *Stroke*, 2004, 35(2): 458– 463.
- [3] Monaco C, Andreacos E, Kiriakidis S, et al. Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(15): 5634–5639.
- [4] 魏运湘, 刘真, 于慧卿, 等. 四妙勇安汤加味对急性心肌梗死患者心肌保护作用的疗效观察 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2010, 8(6): 664–665.
Wei Yunxiang, Liu Zhen, Yu Huiqing, et al. *Chinese Journal of Integrative Medicine on Cardio-/Cerebrovascular Disease*, 2010, 8(6): 664–665.
- [5] 王立茹. 四妙勇安汤治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病 60 例 [J]. *陕西中医*, 2010, 31(2): 131–132.
Wang Liru. *Shaanxi Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2010, 31(2): 131–132.
- [6] 彭立, 张军平. 易损斑块与阴虚毒瘀病机相关理论的探讨 [J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27(5): 970–971.
Peng Li, Zhang Junping. *Chinese archives of Traditional Chinese Medicine*, 2009, 27(5): 970–971.
- [7] 张军平, 许颖智, 李良军, 等. 实验性动脉粥样硬化模型复合建模的方法及评价[J]. *中国比较医学杂志*, 2009, 19(1): 41–45.
Zhang Junping, Xu Yingzhi, Li Liangjun, et al. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2009, 19(1): 41–45.

(责任编辑 吴晓丽)

本期完词填空答案

成	都		但	望	极	楼	高
方		主	丁				拾
圆	周	角		大			明
	恩		碧	海	飞	金	镜
阿	来				干	戈	
		冯		青	藏	铁	路
	生	如	夏	花		马	
唯	物			瓷	都		