

- [16] 罗宇东, 蒋林. 瑶药五指毛桃的质量控制、生产工艺及药理作用研究进展[J]. 中国当代医药, 2014, 21(32): 193-196.
- [17] 熊文, 彭四威, 刘海涛, 等. 补骨脂不同提取工艺的比较研究[J]. 天津中医药大学学报, 2013, 32(2): 98-100.
- [18] 刘俊娥, 刘俊红, 赵铁彦. 高效液相色谱法测定健脾益肾颗粒中补骨脂素和异补骨脂素的含量[J]. 中国医药导报, 2011, 8(34): 70-72.
- [19] 李林轩, 吴庆华, 蔡锦源, 等. 五指毛桃组织培养获得再生植株的研究[J]. 中草药, 2014, 45(17): 2547-2551.
- [20] 韦荣昌. 五指毛桃种植关键技术[J]. 农业研究与应用, 2016, 3(2): 63-65.
- (责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

丹芪通脉破壁饮片颗粒对 apoE^{-/-} 小鼠 主动脉粥样硬化影响的实验研究

李亮, 张俊杰, 张文霞, 王家赐, 林红军, 陈巧玲, 朱盈盈

广州中医药大学附属中山医院, 广东 中山 528400

[摘要] 目的: 观察丹芪通脉破壁饮片颗粒对 apoE^{-/-}小鼠血脂及氧化应激指标的影响, 初步探讨其对主动脉粥样硬化的作用机制。方法: 将 40 只 apoE^{-/-}小鼠以高脂饲料喂养 8 周构建动脉粥样硬化小鼠模型, 随机分为模型组、饮片组、低浓度颗粒组、中浓度颗粒组、高浓度颗粒组, 每组 8 只, 另取 8 只 C57BL/6 雄性小鼠为空白对照组。饮片组以丹芪饮片煎剂 12 g/(kg·d) 灌胃; 低浓度颗粒组、中浓度颗粒组及高浓度颗粒组分别以 1.5、3、6 g/(kg·d) 浓度灌胃丹芪通脉破壁饮片颗粒, 模型组和空白对照组灌胃等量生理盐水。空白对照组以普通饲料喂养, 其余各组小鼠均以高脂高胆固醇饲料喂养。ELISA 法检测血清血脂四项, 检测主动脉组织超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 含量, HE 染色观察小鼠胸主动脉管腔内粥样斑块。结果: 与空白对照组比较, 模型组小鼠从第 4 周开始体质量显著升高, 血清甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 及低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平均显著升高, 小鼠主动脉组织 SOD 和 NO 浓度显著下降, MDA 浓度显著升高; 各给药组小鼠 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 水平均显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 从第 4 周开始, 饮片组及各浓度颗粒组小鼠体质量显著减少, 饮片组、中浓度颗粒组、高浓度颗粒组 TC、TG、LDL-C、MDA 水平均显著下降, 主动脉组织 SOD 和 NO 浓度均显著升高, 低浓度颗粒组 SOD 和 NO 浓度均显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论: 丹芪饮片煎剂及丹芪通脉破壁饮片颗粒均具有改善血脂谱、减轻氧化应激及抗动脉粥样硬化等作用, 疗效一致。

[关键词] 丹芪通脉破壁饮片颗粒; 动脉粥样硬化; 血脂; 氧化应激; 动物实验; apoE^{-/-}小鼠; C57BL/6 小鼠

[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 0256-7415 (2017) 08-0019-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.08.006

Danqi Tongmai Wall-broken Decoction Pieces Granules Have Improving Effect on Aortic Atherosclerosis of ApoE^{-/-}Mice

LI Liang, ZHANG Junjie, ZHANG Wenxia, WANG Jiaci, LIN Hongjun, CHEN Qiaoling, ZHU Yingying

Abstract: objective: To observe effect of Danqi Tongmai wall-broken pieces granules on serum lipids and oxidative stress indexes of apoE^{-/-}mice, and to do preliminary discussion of its mechanism on aortic atherosclerosis. Methods: Selected 40 apoE^{-/-}mice and fed them with high fat diet for eight weeks to establish mice model of atherosclerosis, and divided them into the model group, pieces group, and low, medium and high concentration granule groups, being 8 cases in each. Another 8 C57BL/6 male mice were selected as the blank control group. The pieces group was given Danqi decoction pieces of 12 g/(kg·d) by gavage, low concentration granule group, medium

[收稿日期] 2017-04-11

[基金项目] 中山市科研计划项目(2014A1FC170); 广东省中医药局项目(20141283)

[作者简介] 李亮(1973-), 男, 医学博士, 主任医师, 教授, 主要从事老年疾病、抗衰老及中医养生研究。

concentration granule group and high concentration granule group were given Danqi Tongmai wall-broken pieces granules of 1.5 g/(kg·d), 3 g/(kg·d) and 6 g/(kg·d) respectively by gavage; the model group and the blank control group were given equivalent saline solution. The blank control group was given normal diet while the other groups were given high-fat and cholesterol-rich diet. Detected serum and blood lipid indexes with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), and detected content of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) in aortic tissue, and observed atherosclerotic plaque of the mice with HE staining. **Results** : Compared with the blank control group, from the fourth week, body weight, levels of Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL-C) and low density lipoprotein (LDL-C) of the mice in model group were increased significantly; concentration of SOD and NO in aortic tissue of the mice in model group was significantly reduced, while concentration of MDA was increased significantly; levels of TC, TG, LDL-C and HDL-C in mice of the other groups were increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, from the fourth week, body weight of the mice in the low, medium and high concentration granule groups and the pieces group were reduced significantly; levels of TC, TG, LDL-C, HDL-C and MDA in mice of the medium and high concentration granule groups and the pieces group were reduced significantly, and concentration of SOD and NO in aortic tissue of the mice was increased significantly; concentration of SOD and NO of the mice in the low concentration granule group was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion**: Both of Danqi decoction pieces and Danqi Tongmai wall-broken pieces granule can improve serum lipids profile, reduce oxidative stress and prevent atherosclerosis with the same efficacy.

Keywords: Danqi Tongmai wall-broken pieces granule; Artherosclerosis; Blood lipid; Oxidative stress; Animal experiment; ApoE^{-/-} mice; C57BL/6 mice

大量流行病学研究证实, 动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是导致冠心病、脑卒中、动脉夹层、外周血管病等心脑血管疾病的重要原因, 具有高致死率和致残率等特点^[1]。预防和治疗动脉粥样硬化对于减少心脑血管疾病的发生有重大意义, 活血化瘀类中药在动脉粥样硬化的治疗作用已得到医学界的广泛认可。丹芪通脉破壁饮片颗粒配方中有西洋参、丹参、石斛及三七等, 大量研究证实, 西洋参^[2-3]、丹参^[4]、石斛^[5]及三七^[6-7]均有不同程度的抗动脉粥样硬化作用, 且具有低毒、安全等优势, 适合长期服用, 但饮片剂型具有煎煮耗时长、不便携带等缺陷。丹芪通脉破壁饮片颗粒剂型是运用现代超微粉碎技术, 把药材细胞壁打破, 并经一种国家发明专利成型技术制成极度均匀的细小颗粒状新型产品, 具有方便、省时、利于坚持等优点。本研究以饮片剂型作为对比剂, 探讨改良后的颗粒剂型对动脉粥样硬化的影响, 从而有效指导临床应用。

1 材料与方

1.1 实验动物 6周龄健康雄性 SPF 级 apoE^{-/-} 小鼠 40 只, 体质量(20.0±2.0)g, 购自北京微通利华实验动物技术有限公司(许可证号 SCXK(京)2012-0001); 6周龄健康雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 8 只, 体质量(16.0±1.0)g, 购自广东省动物实验中心(许可证号 SCXK(粤)2015-0109), 所有小鼠均在中山市中医院药理实验中心单笼饲养。

1.2 药品和饲料 丹芪饮片煎剂(简称: 饮片组, 组成: 丹参、西洋参、三七、石斛, 按照 2:2:2:1 比例配伍), 水煎浓缩成含生药浓度为 0.6 g/mL 的药液, 按照 12 倍人体剂量换

算, 根据小鼠与人体体表面积单位换算, 灌胃剂量为 20 mL/kg。丹芪通脉破壁饮片颗粒(简称: 颗粒组)来自中智大药房公司, 丹参破壁颗粒、西洋参破壁颗粒、三七破壁颗粒、石斛破壁颗粒按照 2:2:2:1 比例混合, 破壁颗粒与普通饮片的等效剂量比例按照 1:3 配置, 即 1 g 破壁饮片相当于 3 g 普通饮片剂量。将颗粒组药物溶解配置成低、中、高 3 个浓度, 分别为 0.05 g/mL、0.10 g/mL、0.20 g/mL 的生药浓度, 灌胃剂量为 20 mL/kg。普通饲料: 含 51% 碳水化合物、16% 蛋白质、4% 维生素和矿物质、3% 脂肪, 由广东省动物实验中心提供。高脂饲料: 21% 脂肪, 0.2% 胆固醇, 78.8% 基础饲料, 由特洛菲饲料科技有限公司提供。

1.3 仪器和试剂 YP600 型电子天平(上海精科有限公司); 高速低温离心机(Eppendorf centrifuge 5415R, German); -30℃低温冰箱(日本 SONY 公司); 全自动酶标仪(BIO-TEK ELX800, America); 微量移液器(Gilson, France); 恒温孵育箱(SHEL LAB, America); 紫外可见分光光度计(普析通用 T6, 北京)。丙二醛(MDA)测定试剂盒、一氧化氮(NO)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶测试盒均购自南京建成生物工程研究所。BCA 试剂盒, 购自碧云天生物科技有限公司。

1.4 动物分组及用药 所有动物适应性饲养 1 周后, apoE^{-/-} 小鼠 40 只随机分为模型组、饮片组、低浓度颗粒组、中浓度颗粒组、高浓度颗粒组, 每组 8 只, 取 8 只 C57BL/6 雄性小鼠为空白对照组。饮片组以丹芪饮片煎剂 12 g/(kg·d)灌胃, 低浓度颗粒组、中浓度颗粒组及高浓度颗粒组分别以 1.5、3、

6 g/(kg·d)的浓度灌胃丹芪通脉破壁饮片颗粒,模型组和空白对照组灌胃等量的生理盐水。空白对照组以普通饲料喂养,其余各组小鼠均以高脂饲料喂养。

1.5 标本的采集及处理 体质量:每周称重1次。每天灌胃1次,灌胃剂量为20 mL/kg,灌胃时间为8周。8周结束后,夜间空腹12~14 h,腹腔麻醉,摘眼球取血,低温离心机4℃按4 000 r/min离心10 min,提取上清液,-20℃冰箱保存。解剖小鼠,暴露心脏,找到心尖部,左手用镊子提起心尖部,右手将注射器针头刺破心尖部进针,见回血,用止血钳固定针尖,剪开右心耳,缓慢匀速注入20 mL PBS开始灌流心脏;然后换成4%多聚甲醛20 mL,5 min内完成。PBS灌流时,灌注液混着血液从右心耳处流出,直到从右心耳流出的液体为无色,同时小鼠肝颜色淡,肠管肿胀,停止灌流。4%多聚甲醛灌流时,此时如果看到小鼠四肢突然紧张,尾部卷曲,说明达到固定效果。灌流结束后,尾巴及全身各器官僵硬,将小鼠沿腹中线切开皮肤及皮下薄膜,暴露肺、肝、胃、肠、脾、胰腺、肾等各器官。主动脉根部至腹主动脉末端分离整条主动脉,将主动脉组织投入新鲜配制的4%多聚甲醛固定液中和液氮中,前者在4℃冰箱保存,后者需放置于-80℃冰箱保存。

1.6 血脂测定 采用生化试剂盒测各组小鼠血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平。

1.7 主动脉组织氧化应激测定 取出10 mg液氮冷冻的胸主动脉组织,加入90 mL预冷的0.9%生理盐水,操作在冰上进行,制备好后,4 000 r/min离心10 min,取上清液待测。按照说明书,使用总超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒测定主动脉组织超氧化物歧化酶活力,MDA测定试剂盒测定主动脉组织MDA,NO测定试剂盒测定主动脉组织一氧化氮NO含量。

1.8 病理形态学检查 取出胸主动脉,固定于4%的多聚甲醛中24 h,常规石蜡包埋切片,HE染色,光镜下观察胸主动脉形态学改变。

1.9 统计学方法 所有试验数据用SPSS13.0软件进行统计学分析,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,计量资料各组间的比较用单因素方差分析,方差不齐用Welch法及Brown-Forsythe近似法。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量变化比较 见表1。与空白对照组比较,模型组小鼠从第4周开始体质量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,从第4周开始,饮片组及各浓度颗粒组小鼠体质量显著减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.2 各组小鼠血脂水平比较 见表2。与空白对照组比较,模型组及各给药组小鼠TC、TG、LDL-C及HDL-C水平均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,饮片

组、中浓度颗粒组、高浓度颗粒组TC、TG、LDL-C水平均显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表1 各组小鼠体质量变化比较 $(\bar{x} \pm s)$ g

组别	n	0 w	2 w	4 w	6 w	8 w
空白对照组	8	20.6±1.27	21.4±0.86	22.4±0.78	23.1±0.59	24.0±0.95
模型组	8	20.5±1.58	22.7±1.24	25.6±1.09	27.5±1.15	28.6±1.30
饮片组	8	20.4±1.66	21.3±0.94	22.3±0.64	22.5±0.71	23.2±1.12
低浓度颗粒组	8	20.3±0.90	21.5±1.02	22.8±0.98	23.5±0.86	24.4±1.01
中浓度颗粒组	8	20.2±0.61	21.5±1.03	21.9±0.98	22.7±0.93	23.2±1.08
高浓度颗粒组	8	20.6±0.90	21.3±0.67	22.2±0.78	22.8±0.61	23.8±0.74

与空白对照组比较,① $P < 0.05$,② $P < 0.01$;与模型组比较,③ $P < 0.05$,④ $P < 0.01$

表2 各组小鼠血脂水平比较 $(\bar{x} \pm s)$ mmol/L

组别	n	TC	TG	HDL-C	LDL-C
空白对照组	8	2.28±0.26	0.83±0.06	0.46±0.17	1.92±0.44
模型组	8	9.87±1.49	7.48±0.73	3.00±0.48	5.97±0.63
饮片组	8	6.34±1.13	6.18±0.41	2.04±0.35	4.21±0.50
低浓度颗粒组	8	8.01±1.21	6.42±0.20	2.66±0.16	5.82±0.62
中浓度颗粒组	8	7.09±1.02	6.24±0.46	2.15±0.56	4.40±0.88
高浓度颗粒组	8	5.80±0.91	5.79±0.26	1.58±0.16	3.39±0.76

与空白对照组比较,① $P < 0.01$;与模型组比较,② $P < 0.05$,③ $P < 0.01$

2.3 各组小鼠主动脉氧化应激指标水平比较 见表3。与空白对照组比较,模型组小鼠主动脉组织SOD和NO浓度显著下降,MDA浓度显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,饮片组、中浓度颗粒组、高浓度颗粒组主动脉组织SOD和NO浓度均显著升高,而MDA含量显著下降,低浓度颗粒组SOD和NO浓度均显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与饮片组比较,低浓度颗粒组和中浓度颗粒组主动脉组织SOD和NO浓度显著下降,而低、中、高浓度颗粒组MDA含量显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与低浓度颗粒组比较,中浓度颗粒组主

表3 各组小鼠主动脉氧化应激指标水平比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	n	SOD(U/mg prot)	MDA(nM/mg prot)	NO(μ M/mg prot)
空白对照组	8	61.46±9.09	0.68±0.05	9.58±0.42
模型组	8	25.52±5.71	4.16±1.21	3.49±0.10
饮片组	8	70.02±4.32	0.36±0.07	8.83±1.10
低浓度颗粒组	8	35.96±1.48	4.79±0.72	5.07±0.20
中浓度颗粒组	8	58.33±8.64	3.07±0.50	6.89±0.49
高浓度颗粒组	8	80.46±9.92	1.45±0.10	9.94±1.17

与空白对照组比较,① $P < 0.01$;与模型组比较,② $P < 0.05$,③ $P < 0.01$;与饮片组比较,④ $P < 0.05$,⑤ $P < 0.01$;与低浓度颗粒组比较,⑥ $P < 0.05$,⑦ $P < 0.01$;与中浓度颗粒组比较,⑧ $P < 0.05$

动脉组织 SOD 浓度升高, 而高浓度颗粒组 SOD 和 NO 浓度显著升高, MDA 浓度显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与中浓度组比较, 高浓度颗粒组动脉组织 SOD 升高, MDA 含量下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.4 各组小鼠主动脉组织病理学图片 见图 1。模型组主动脉管壁厚薄不均, 可见大量充满脂质的泡沫细胞, 胆固醇结晶

裂隙的粥样斑块病灶明显, 内膜广泛而明显的纤维化、增厚, 血管壁向管腔内突出, 内膜平滑肌明显变薄; 各给药组间小鼠主动脉根部粥样斑块明显减轻。与模型组比较, 各给药组小鼠主动脉根部病变得以不同程度的控制, 其中低浓度颗粒组小鼠主动脉根部斑块内的脂质中心面积相对变小, 纤维帽较厚; 高、中浓度颗粒组动脉粥样硬化病变最轻。

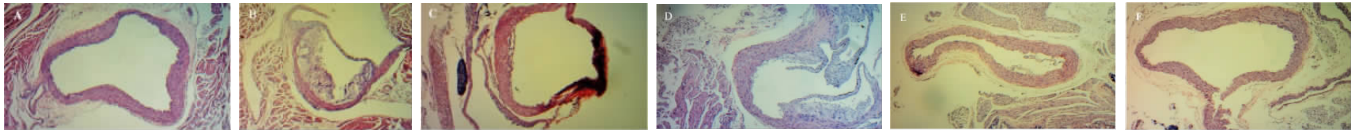


图 1 各组小鼠主动脉组织病理学图片 (×100)

3 讨论

AS 的主要病理生理基础是由白细胞、血流紊乱和血管壁之间的动态相互作用形成的, 其具体发病机制至今尚未明确, 越来越多研究认为动 AS 是综合因素导致的全身性疾病, 中医药在治疗 AS 方面具有独到优势, 许多研究均证实^[8], 丹参、西洋参、石斛、三七均有不同程度的抗 AS 的作用。

本研究中, 我们发现丹芪饮片煎剂与破壁颗粒剂型均能够有效减轻因高脂饮食导致的小鼠体质量增加, 颗粒剂型的不同剂量之间无明显量效关系。丹芪通脉破壁饮片颗粒剂型能够有效降低血脂, 具有显著的抗氧化应激作用, 能有效增强主动脉内舒血管物质 NO 的浓度, 有效改善动脉粥样斑块的作用, 且随着剂量增加, 抗 AS 效果得到显著增强。等效剂量的丹芪饮片水煎剂与丹芪通脉破壁饮片颗粒均表现出显著的抗氧化应激作用, 二者之间无明显差别。近年来研究表明, 氧化应激参与了 AS 的发生与发展过程, 一方面氧化应激产生的过量氧自由基直接攻击血管壁细胞造成损伤; 另一方面, 其通过影响血管壁细胞转录因子, 调节基因表达促进 AS 发展^[9-10]。

实验中发现, 丹芪通脉破壁饮片颗粒能够有效降低实验小鼠 TC、TG、LDL-C 水平, 以中、高浓度颗粒组效果显著, 而低剂量组未见明显效果。各给药组 TC、TG、LDL-C 较空白对照组仍显著升高, 但从病理切片结果来看, 抗 AS 效果明显。由此, 笔者推断丹芪通脉破壁饮片颗粒的抗动脉粥样硬化疗效与其强效抗氧化应激、减轻血管内炎症反应有关。

[参考文献]

- [1] 中国中西医结合学会心血管病专业委员会血脂与动脉粥样硬化学组. 动脉粥样硬化中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国全科医学, 2017, 20(5): 507-511.
- [2] 李红蓉, 位庚, 刘红利, 等. 人参属植物有效成分的抗炎作用与其在动脉粥样硬化相关的心脑及周围血管病变

中的应用[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(6): 1699-1701.

- [3] 王承龙, 殷惠军, 史大卓, 等. 西洋参茎叶皂苷心血管药理研究概述[J]. 中药新药与临床药理, 2006, 17(1): 76-78.
- [4] 段媛媛, 郭振丰, 李雪连. 丹参酮 A 治疗心血管疾病研究机制新进展[J]. 中国临床药理学杂志, 2016, 32(19): 1817-1820.
- [5] 李亚梅, 吴萍, 谢雪皎, 等. 铁皮石斛对 ApoE-/- 小鼠血脂及 TNF- α , IL-6 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(18): 270-274.
- [6] 王楠, 万建波, 李铭源, 等. 三七治疗动脉粥样硬化的研究进展[J]. 中草药, 2008, 39(5): 787-790.
- [7] 韩淑娴, 游云. 三七总皂苷心脑血管药理作用及其溶血反应[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(5): 818-822.
- [8] 严春琳, 杨静, 韩际宏, 等. 中药抗动脉粥样硬化机制研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(6): 904-913.
- [9] Papaharalambus CA, Griending KK. Basic mechanisms of oxidative stress and reactive oxygen species in cardiovascular injury[J]. Trends Cardiovasc Med, 2007, 17(2): 48-54.
- [10] Antoniadou C, Shirodaria C, Leeson P, et al. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis [J]. Eur Heart J, 2009, 30 (9): 1142-1150.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)