

- [8] Beyer A, Schäfer M, Stein C. Antinociceptive effects of dynorphin peptides in a model of inflammatory pain[J]. *Pain*, 1997, 70(2-3): 141-147.
- [9] 方剑乔, 刘芳, 邵晓梅, 等. 电针对角叉菜胶致炎大鼠的抗炎效应及对白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. *针刺研究*, 2007, 32(4): 224-228.
- [10] 陈益丹, 邱华平, 金肖青, 等. 不同针灸方法对膝骨关节炎模型细胞因子及基质金属蛋白酶影响的比较研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(1): 42-45.
- [11] 韩济生. 针刺镇痛频率特异性的进一步证明[J]. *针刺研究*, 2001, 26(3): 224-225.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)

补阳还五汤对 ApoE 基因缺陷小鼠血脂及动脉粥样硬化斑块炎症反应的影响

李土明, 吴滢, 徐丽英, 钟萍

上海中医药大学附属上海市中西医结合医院, 上海 200082

[摘要] 目的: 观察补阳还五汤对 ApoE 基因缺陷 (ApoE^{-/-}) 小鼠血脂及动脉粥样硬化斑块炎症因子脂蛋白相关磷脂酶 A2 (Lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2) 及基质金属蛋白酶-9 (Matrix Metalloproteinase-9, MMP-9) 的影响。方法: 34 只 ApoE^{-/-} 小鼠高脂饮食 12 周, 随机取 4 只确定造模成功后, 余 30 只按随机数字表随机分成模型组、补阳还五汤组、阿托伐他汀组, 每组 10 只。补阳还五汤组给予补阳还五汤 20 g/(kg·d) 灌胃; 阿托伐他汀组给予阿托伐他汀 5 mg/(kg·d) 灌胃; 模型组给予等量生理盐水。给药 4 周后, 测定血脂水平, 并采用 ELISA 法测定血清 Lp-PLA2 及 MMP-9 水平。结果: 与模型组比较, 补阳还五汤组、阿托伐他汀组小鼠总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG) 及低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平均下降, 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平升高, 血清 Lp-PLA2 和 MMP-9 水平明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。补阳还五汤组小鼠 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平、血清 Lp-PLA2 和 MMP-9 水平与阿托伐他汀组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 补阳还五汤具有抗动脉粥样硬化作用, 下调血脂水平和降低炎症反应可能是其作用机制之一。

[关键词] 补阳还五汤; 动脉粥样硬化; 炎症反应; 脂质代谢; 动物实验; 小鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 02-0005-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.02.002

Buyang Huanwu Tang Has Effect on Blood Lipid and Inflammatory Reaction of Atherosclerosis Plaque in ApoE Gene-Deficient Mice

LI Tuming, WU Ying, XU Liying, ZHONG Ping

Abstract: Objective: To observe the effect of Buyang Huanwu tang on blood lipid and inflammatory factors of atherosclerosis plaque such as lipoprotein-associated phospholipase A2(Lp-PLA2) and matrix metalloproteinase-9(MMP-9) in apoe gene-deficient(ApoE^{-/-}) mice. **Methods:** Thirty-four ApoE^{-/-} mice were fed with high-fat diet for 12 weeks. Randomly selected 4 of them to determine success of the models. After establishing successful models, divided the rest 30 mice into the model group, Buyang Huanwu tang group, and atorvastatin group randomly according to random number table, 10 mice in each group. Buyang Huanwu tang group was given 20 g/(kg·d) of Buyang Huanwu tang by gavageand, atorvastatin group was given 5 mg/(kg·d) of atorvastatin by gavage. The model group was given equivalent amount of saline. After 4 weeks of medication, measured the blood lipid level, and detected levels of Lp-PLA2 and MMP-9 in serum with ELISA method. **Results:** Compared with those in the model group, in Buyang Huanwu tang group and atorvastatin group, levels of total

[收稿日期] 2017-07-07

[基金项目] 上海中医药大学预算内项目 (2015YSN61); 上海市虹口区卫生局课题 (虹卫 1503-04)

[作者简介] 李土明 (1981-), 男, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗脑血管病。

[通信作者] 钟萍, E-mail: zphgl@163.com。

cholesterol(TC), triglyceride(TG), and low density lipoprotein cholesterol(LDL-C) of mice were all decreased, levels of high-density lipoprotein cholesterol(HDL-C) were increased, and levels of Lp-PLA2 and MMP-9 in serum were obviously reduced, differences being significant($P < 0.05$). Compared the levels of TC, TG, LDL-C, HDL-C, Lp-PLA2, and MMP-9 in Buyang Huanwu tang group with those in atorvastatin group, there was no significance being found in differences ($P > 0.05$). **Conclusion:** Buyang Huanwu tang has an anti-atherosclerosis effect, and one of its mechanism may be the function of lowering blood lipid and reducing inflammatory reaction.

Keywords: Buyang Huanwu tang; Atherosclerosis; Inflammatory reaction; Lipid metabolism; Animal experiment; Mice

脂质代谢异常和炎症反应是动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)形成和发展的病理生理学基础。炎症不仅是AS斑块发生、发展的基础,也是诱发斑块不稳定的关键因素^[1]。脂蛋白相关磷脂酶A2(Lipoprotein-associated phospholipase A2, Lp-PLA2)被认为是动脉粥样硬化过程中调节多种炎症因子和炎症细胞的中心物质之一,参与了动脉粥样斑块形成、发生发展的各个阶段^[2]。基质金属蛋白酶-9(Matrix Metalloproteinase-9, MMP-9)可通过降解细胞外基质,使AS斑块向易损斑块转化,诱发斑块破裂,导致血栓形成及栓塞事件。中医学认为AS的基本特征为本虚标实,临床以气虚血瘀证型较为常见,益气活血治疗能明显降低该病的发病率、致残率和病死率^[3]。本课题组前期临床观察中发现补阳还五汤可改善脑梗死患者神经功能缺损评分,并可明显降低炎症因子超敏C-反应蛋白和白细胞介素-6等水平^[4-5]。本研究运用益气活血中药的名方—补阳还五汤对动脉粥样硬化动物模型进行干预,观察对血脂和炎症因子Lp-PLA2、MMP-9的影响,以进一步探讨其抗动脉粥样硬化的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6~8周龄雄性ApoE基因缺陷(ApoE^{-/-})小鼠34只(购自北京维通利华实验动物技术有限公司),SPF级,实验动物生产许可证编号:SCXK(京)2012-0001,体质量16~18g,动物合格证号:11400700191696。上海中医药大学实验动物中心SPF级动物房适应性喂养2周,室温保持在22~24℃,相对湿度50%,光照时间7:00~19:00。

1.2 实验药物 补阳还五汤(药物组成:黄芪30g,当归尾12g,赤芍、川芎、干地龙、红花、桃仁各6g)由上海中医药大学附属上海市中西医结合医院中药房提供,加工成生药2g/mL的浓缩液备用。阿托伐他汀(辉瑞制药有限公司,批号:J26050,规格

20mg/片)。

1.3 实验试剂和仪器 采用HITACHI7600-020全自动生化分析仪(日本日立公司)检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)和低密度脂蛋白(LDL-C)。Lp-PLA2及MMP-9试剂盒由上海博谷生物科技有限公司提供,用芬兰Thermo公司全自动酶标仪(DENLEY DRAGON Wellscan MK 3)进行检测,严格按照说明书要求操作。HE染色主要试剂为苏木精染液、伊红染液等(珠海贝索生物技术有限公司)。OLYMPUS CX41显微镜(日本奥林巴斯公司),IMS图象分析系统(上海基尔顿生物科技有限公司),离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.4 模型制备 34只ApoE^{-/-}小鼠给予高脂饮食(由基础饲料80.5%、胆固醇2.0%、猪胆盐2.5%、蛋黄10.0%、猪油5.0%组成,苏州双狮实验动物饲料科技有限公司提供)12周,随机处死4只,取主动脉根部,10%甲醛固定,脱水,常规石蜡包埋切片,切片厚5μm,每间隔100μm连续取2张切片。常规HE染色,光镜下观察主动脉组织动脉粥样硬化病理变化,确定造模成功。

1.5 动物分组与给药 将造模成功小鼠称重编号,使用随机数字表法按照体质量将小鼠随机分成模型组、补阳还五汤组、阿托伐他汀组,每组10只。补阳还五汤组给予补阳还五汤20g/(kg·d)灌胃;阿托伐他汀组给予阿托伐他汀5mg/(kg·d)灌胃;模型组给予等量生理盐水,共给药4周。

1.6 标本采集 给药4周后,于取材前夜禁食,10%水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,抗凝,在3000r/min离心,0.5mL血清用作血脂检测。余血清置于-80℃冰柜保存,以备测定Lp-PLA2及MMP-9水平。

1.7 血脂测定 TC、TG、HDL-C和LDL-C,采用HITACHI7600-020全自动生化分析仪测定。

1.8 Lp-PLA2和MMP-9水平测定 采用双抗体夹

心 ABC-ELISA 法测定。用抗小鼠 Lp-PLA2 单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的 Lp-PLA2 与单抗结合,加入生物素化的抗小鼠 Lp-PLA2,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记链霉亲和素与生物素结合,加入底物工作液显蓝色,最后加终止液硫酸,在 450 nm 处测 OD 值, Lp-PLA2 浓度与 OD 值成正比,可通过绘制标准曲线求出标本中 Lp-PLA2 浓度。MMP-9 测定与 Lp-PLA2 测定方法基本类似。

1.9 统计学方法 采用 SAS9.2 进行统计学处理,计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 一般情况 整个实验期间,各组动物反应灵敏,皮毛色白、致密有光泽,进食活跃,活动良好。实验过程各组小鼠均无死亡。

2.2 模型组小鼠动脉粥样斑块的观察 见图 1。HE 染色光镜下可见:主动脉根部可以看到明显的动脉粥样斑块形成,泡沫细胞、脂质核明显,纤维帽薄,局部可见巨噬细胞聚集,血管中膜结构严重破坏,脂质侵蚀,萎缩及钙化,显示出易损斑块的特征。

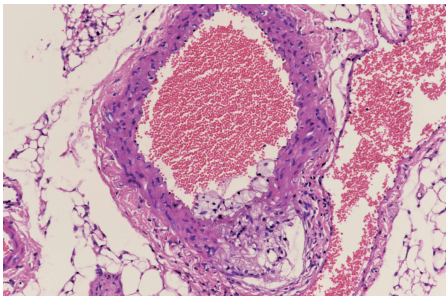


图 1 模型组小鼠主动脉组织病理图片 (×200)

2.3 各组小鼠血脂水平比较 见表 1。与模型组比较,补阳还五汤组、阿托伐他汀组 TC、TG 及 LDL-C 水平均下降, HDL-C 水平升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。补阳还五汤组血脂指标与阿托伐他汀组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠血脂水平比较 $(\bar{x} \pm s)$ mmol/L

组别	n	TC	TG	LDL-C	HDL-C
模型组	10	18.64±2.39	1.82±0.34	2.02±0.35	0.71±0.11
补阳还五汤组	10	16.57±1.02 ^①	1.44±0.17 ^①	1.31±0.32 ^①	1.50±0.47 ^①
阿托伐他汀组	10	15.88±0.91 ^①	1.49±0.12 ^①	1.20±0.43 ^①	1.48±0.51 ^①

与模型组比较, ^① $P < 0.05$

2.4 各组小鼠血清 Lp-PLA2 和 MMP-9 水平比较 与模型组比较,补阳还五汤组、阿托伐他汀组血清 Lp-PLA2 和 MMP-9 水平明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。补阳还五汤组血清 Lp-PLA2 和 MMP-9 水平与阿托伐他汀组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠血清 Lp-PLA2 和 MMP-9 水平比较 $(\bar{x} \pm s)$ ng/ml

组别	n	Lp-PLA2	MMP-9
模型组	10	14.50±3.74	314.80±68.11
补阳还五汤组	10	8.20±3.58 ^①	249.45±60.09 ^①
阿托伐他汀组	10	8.19±2.99 ^①	217.16±75.92 ^①

与模型组比较, ^① $P < 0.05$

3 讨论

ApoE^{-/-} 小鼠由于先天体内缺少 ApoE 基因,导致对脂蛋白代谢异常,加以高脂饮食喂养极易形成动脉粥样硬化及自发性高胆固醇血症,其动脉粥样硬化发展包括脂质条纹到有纤维帽覆盖的成熟斑块等各个阶段,与人类 AS 斑块类似,其优点是速度更快、质量更高、更加接近自然发生的动脉粥样硬化进程,是目前研究 AS 斑块较为理想的动物模型^[6]。在本实验中以高脂饲料饲养的 ApoE^{-/-} 小鼠,主动脉根部可见典型动脉粥样斑块(被纤维帽包裹的粥样脂质核,脂质核内可见胆固醇结晶和大量泡沫细胞),提示造模成功。

脂质代谢紊乱是 AS 发病的主要机制之一,通过降脂治疗,血浆胆固醇水平的降低可使斑块内的脂质减少, LDL-C 的降低使进入斑块内的胆固醇下降, HDL-C 的升高有利于 LDL 从血管壁及巨噬细胞中转移,增加斑块的稳定性^[7-8]。他汀类药物可明显降低 LDL-C,升高 HDL-C,减轻氧化修饰低密度脂蛋白胆固醇的致 AS 及细胞毒性作用,改善内皮细胞功能,临床上广泛应用于治疗缺血性心脑血管疾病。

炎症细胞和因子几乎参与了动脉粥样硬化发生发展的全部过程。Lp-PLA2 是一种由巨噬细胞和泡沫细胞等在炎症的刺激作用下产生和分泌的一种磷脂酶,其可以水解低密度脂蛋白(LDL)表面的磷脂甘油支架 sn-2 位上的乙酰基,生成促炎物质溶血卵磷脂(LysoPC)和游离的氧化脂肪酸(oxFA)。这两种较强的致炎和致动脉粥样硬化因子通过上调黏附因子、细胞因子和 CD40 配体的表达水平,削弱内皮依赖的血管

扩张功能,同时刺激巨噬细胞的增殖和炎症细胞的趋化,并产生金属蛋白酶,最终导致粥样硬化斑块的形成^[9]。Lp-PLA2在动脉粥样硬化患者体内水平升高,且其酶促反应产物进一步促进了动脉粥样硬化斑块中炎症反应和细胞凋亡的进程,使斑块容易发生破裂,可以作为预测斑块稳定性的一个新的分子学指标^[10]。近几年来,国外指南已明确提出Lp-PLA2可作为卒中或急性动脉粥样硬化高风险者的评估指标^[11]。MMP-9是一种属于金属蛋白酶家族的明胶酶,是一种消化细胞外基质并降解基底膜成分的酶。MMP-9通过降解细胞外基质,可使斑块表面纤维帽的完整性遭到破坏,使AS斑块向易损斑块转化,诱发斑块破裂,导致血栓形成及栓塞事件^[12]。MMP-9是动脉粥样硬化斑块不稳定的生化标志,血清MMP-9水平越高,斑块的稳定性越低^[13],可以作为降低急性心脑血管事件发生的潜在治疗靶点。

中医药有多成分、多途径、多环节、多靶点、多效应,不良反应少,协同作用强和整体调节的特点。中医学认为本虚标实是AS的基本特征,气虚血瘀是AS的临床常见证型,益气活血能明显改善临床症状。补阳还五汤为益气活血的代表方剂,药理研究表明:其能改善微循环,提高组织耐氧的能力;改变血液流变学的性质,降低血脂;抑制血液凝固,抗血栓形成及预防血栓再发;促进组织的修复和再生;抑制胶原纤维的合成,抗组织增生,促进增生性病变的转化和吸收;抗血小板聚集、降低纤维蛋白原;抗血栓形成及预防血栓形成,具有抗AS作用^[14]。

本实验发现,补阳还五汤能够明显降低TC、TG及LDL-C水平,升高HDL-C水平,具有抗动脉粥样硬化作用;补阳还五汤组能够明显降低炎症因子Lp-PLA2和MMP-9的水平。补阳还五汤具有稳定动脉粥样硬化斑块的作用,机制可能与其能够加速脂质代谢和抗炎性反应有关。

[参考文献]

- [1] Lowe GD. The relationship between infection, inflammation, and cardiovascular diseases: an overview[J]. *Ann Periodontol*, 2001, 6(1): 1-8.
- [2] Garg PK, Mcclelland RL, Jenny NS, et al. Association of lipoprotein-associated phospholipase A(2) and endothelial function in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA)[J]. *Vasc Med*, 2011, 16(4): 247-252.
- [3] 王承龙,史大卓,王强,等.运用Markov模型评价益气活血中药干预不稳定心绞痛远期疗效的探索[J].*中国中西医结合杂志*, 2014, 34(4): 406-411.
- [4] 李土明,钟萍,吴滢.补阳还五汤加减对急性脑梗死hs-CRP、IL-6及PCT影响的临床研究[J].*江苏中医药*, 2015, 47(6): 34-35.
- [5] 李土明,钟萍,吴滢.补阳还五汤对急性脑梗死患者血清白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、白细胞介素-18表达的影响[J].*河北中医*, 2016, 38(9): 1353-1360.
- [6] 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.
- [7] Tailleux A, Duriez P, Fruchart JC, et al. Apolipoprotein A-II, HDL metabolism and atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2002, 164(1): 1-13.
- [8] Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Effect of intensive compared with moderate lipid-lowering therapy on progression of coronary atherosclerosis: a randomized controlled trial[J]. *JAMA*, 2004, 291(9): 1071-1080.
- [9] Ikonomidis I, Kadoglou NN, Tritakis V, et al. Association of Lp-PLA2 with digital reactive hyperemia, coronary flow reserve, carotid atherosclerosis and arterial stiffness in coronary artery disease[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 234: 34-41.
- [10] Liu CF, Qin L, Ren JY, et al. Elevated plasma lipoprotein-associated phospholipase A2 activity is associated with plaque rupture in patients with coronary artery disease[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2011, 124(16): 2469-2473.
- [11] Meschia JF, Bushnell C, Boden-Albala B, et al. Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association[J]. *Stroke*, 2014, 45(12): 3754-3832.
- [12] Kunte H, Kunte G, Busch MA, et al. Differences in carotid plaque content of macrophages, T cells and MMP-9 between patients with embolic and hemodynamic cerebral ischemia due to symptomatic carotid stenosis[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 211(2): 456-460.
- [13] 高菊华,高小平.颈动脉粥样硬化斑块CD147、MMP-9表达及阿托伐他汀干预的影响[J].*中华神经医学杂志*, 2010, 9(11): 1081-1085.
- [14] 黄兴,李艳芬,寇冠军,等.补阳还五汤抗动脉粥样硬化作用机制研究进展[J].*中华中医药杂志*, 2017, 32(3): 1187-1190.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)