

◆方药实验研究◆

柴白温胆汤对动脉粥样硬化大鼠氧化应激和炎症因子表达的影响

李志尚¹, 蔡海荣², 冯文伟³, 赵帅¹, 张为章¹,
高焕佳², 赵子聪², 陈燕虹², 陈伯钧¹

1. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510120
2. 广州中医药大学第二临床医学院, 广东 广州 510405
3. 东莞市中医院, 广东 东莞 523000

[摘要] 目的: 探讨柴白温胆汤对动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 大鼠氧化应激和炎症因子表达的影响。方法: 将45只大鼠分为对照组、模型组、他汀组 and 柴白温胆汤组, 用维生素D3联合高脂饲料喂养8周建立AS模型, 并给予相应的药物灌胃4周。第12周检测各组大鼠的体质量、总胆固醇 (Total cholesterol, TC)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、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)、核转录因子 (Nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、超敏C-反应蛋白 (Hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、丙二醛 (Malonaldehyde, MDA) 及活性氧簇 (Reactive oxygen species, ROS) 水平。结果: 与对照组比较, 模型组大鼠体质量、TC、TG、LDL-C、NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、hs-CRP、MDA、ROS水平明显升高 ($P < 0.05$), HDL-C、SOD、GSH-Px、CAT水平明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 柴白温胆汤组和他汀组大鼠体质量、TC、TG、LDL-C、NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、hs-CRP、MDA、ROS水平明显降低 ($P < 0.05$), HDL-C、SOD、GSH-Px、CAT水平明显升高 ($P < 0.05$)。与他汀组比较, 柴白温胆汤组各检测指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 柴白温胆汤可能通过抑制NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、hs-CRP、MDA、ROS的表达, 促进HDL-C、SOD、GSH-Px、CAT的表达来防治AS。

[关键词] 柴白温胆汤; 动脉粥样硬化 (AS); 氧化应激; 炎症因子; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 06-0001-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.06.001

Chaibai Wendan Tang Has Effect on Oxidative Stress and Expression of Inflammatory Factors in Rats with Atherosclerosis

LI Zhishang, CAI Hairong, FENG Wenwei, ZHAO Shuai, ZHANG Weizhang,
GAO Huanjia, ZHAO Zicong, CHEN Yanhong, CHEN Bojun

Abstract: **Objective:** To explore the effect of Chaibai Wendan tang on oxidative stress and expression of inflammatory factors in rats with atherosclerosis. **Methods:** 45 rats were divided into the control group, the model group, the statin group and the Chaibai Wendan tang group randomly, 10 rats in each group. The model of rats with AS was established by feeding them with vitamin D3 combined with high fat feed for 8 weeks and giving them corresponding medicine via gavage for 4 weeks. In the 12th week, detected the levels of body mass, total cholesterol(TC), triglyceride(TG), low density lipoprotein cholesterol(LDL-C), high density lipoprotein cholesterol(HDL-C), nuclear transcription factor- κ B(NF- κ B), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), hypersensitive C-reactive protein (hs-CRP), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase(CAT), malonaldehyde(MDA) and reactive oxygen species (ROS)

[收稿日期] 2018-11-15

[基金项目] 国家自然科学基金委员会面上项目 (81273961); 广东省中医药局科研基金项目 (20151207); 广东省中医院中医药科学技术专项 (YN2015MS11)

[作者简介] 李志尚 (1984-), 男, 主治医师, 研究方向: 中西医结合治疗心血管急危重症。

[通信作者] 陈伯钧, E-mail: 13902299108@163.com。

of rats in each group. **Results:** Comparing with the control group, the levels of body mass, TC, TG, LDL-C, NF- κ B, TNF- α , IL-6, IL-1 β , hs-CRP, MDA and ROS of rats in the model group were significantly increased ($P < 0.05$), and the levels of HDL-C, SOD, GSH-Px and CAT were significantly decreased ($P < 0.05$). Comparing with the model group, the levels of body mass, TC, TG, LDL-C, NF- κ B, TNF- α , IL-6, IL-1 β , hs-CRP, MDA and ROS of rats in the statin group and the Chaibai Wendan tang group were significantly decreased ($P < 0.05$), and the levels of HDL-C, SOD, GSH-Px and CAT were significantly increased ($P < 0.05$). Comparing with the statin group, there was no significant difference being found in each index in the Chaibai Wendan tang group ($P > 0.05$). **Conclusion:** Chaibai Wendan tang may prevent and treat AS by means of inhibiting the expression of NF- κ B, TNF- α , IL-6, IL-1 β , hs-CRP, MDA and ROS and promoting the expression of HDL-C, SOD, GSH-Px and CAT.

Keywords: Chaibai Wendan tang; Atherosclerosis (AS); Oxidative stress; Inflammatory factors; Rats

中国心血管疾病(Cardiovascular disease, CVD)报告指出我国目前约有CVD患者2.9亿, CVD已成为我国居民致死、致残的首要原因^[1]。CVD不仅严重影响我国居民的健康和生质量, 而且对患者家庭和社会造成严重的经济负担^[2]。动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是一种动脉管壁增厚、变硬, 失去弹性, 管腔狭窄甚至堵塞的慢性非炎症性疾病。AS是CVD的重要病理基础, 影响着CVD的发生和发展^[3]。随着社会进步、生活方式的改变和人口老龄化进程的加速, AS的发病率呈现上升和年轻化的趋势^[4]。因此, 积极干预AS对防治CVD有重要的意义。氧化应激反应和炎症反应是AS发生、发展的核心机制^[5-9]。中药有多靶点、多成分、整体调节、协调作用强等优点^[7], 柴白温胆汤是在陈伯钧教授临床上使用多年的经验方, 由温胆汤和柴胡疏肝散化裁而来, 对冠状AS有良好的疗效, 但其具体机制尚未阐明。本实验复制了AS模型, 观察柴白温胆汤对AS大鼠血脂、氧化应激反应和炎症反应的影响, 初步探讨其防治AS的机制。

1 材料与方

1.1 实验动物 SPF级健康SD大鼠45只, 4~5周龄, 体重(100±10)g, 购自广东省医学实验动物中心, 许可证号: SYXK(粤)2013-0002。于温度(22±5)℃, 湿度50%, 光照时间每天12h, 分笼饲养, 每笼2只, 自由进水。

1.2 实验材料和仪器 普通饲料(配方: 蛋白质22%, 脂肪10%, 碳水化合物68%); 高脂饲料(配方: 基础饲料65.3%, 猪油15%, 蔗糖10%, 蛋黄5%, 胆固醇4%, 胆酸钠0.5%、丙基硫氧嘧啶0.2%), 均购自广东省医学实验动物中心。柴白温胆汤(半夏10g, 竹茹、柴胡各12g, 枳实、陈皮、白芍、丹参各15g, 甘草6g, 茯苓20g), 上述中药饮片均由广州中医药大学第二附属医院药剂科提供。煎煮方法: 上述中药饮片加6倍量的水浸泡30min后煎煮40min, 滤渣取液, 药渣再加4倍量的水煎煮30min, 滤渣取液, 2次药液混合, 然后置于100℃环境浓缩至2g/mL, -4℃保存。阿托伐他汀钙片(美国辉瑞制药有限公司, 规格: 20mg/片, 7片/盒, 批号20160262); 大鼠核转录因子(Nuclear transcription factor- κ B,

NF- κ B)、肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor α , TNF- α)、白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、超敏C-反应蛋白(Hypersensitive C-reactive protein, hs-CRP)ELISA试剂盒均购自美国赛默飞公司; 超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GSH-Px)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、丙二醛(Malonaldehyde, MDA)、活性氧簇(Reactive oxygen species, ROS)ELISA试剂盒购自上海武昊生物科技有限公司; 总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholestreol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholestreol, HDL-C)检测试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。

FC5718R 230V 多功能冷冻离心机[奥豪斯国际贸易(上海)有限公司]; ICS685k-35LA/f 电子台秤[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司]; DYS-309型透反射生物显微镜(上海点应光学仪器有限公司); WMTV4860 三目高倍视频显微镜(上海无陌光学仪器有限公司); 7180型全自动生化分析仪(株式会社日立高新技术公司); BP-98A尾动脉血压测量仪[森西万通科技(北京)有限公司]; 罗氏血糖仪[罗氏诊断产品(上海)有限公司]。

1.3 模型制备、分组及给药 45只大鼠适应性喂养7天, 待其代谢状态稳定后, 每只分笼喂养。35只大鼠参照刘炜枫等^[8]AS大鼠造模方法: 造模第1天, 按照60万Ug/kg的剂量一次性给予维生素D3腹腔注射, 然后每天给予高脂饲料喂养, 剂量为每天20g, 分2次喂服。剩余10只大鼠作为对照组, 造模第1天给予等体积的生理盐水一次性通过耳缘静脉注射, 然后给予普通饲料每天20g进行喂养, 分2次喂服。造模期间所有大鼠均自由饮水, 共喂养8周, 8周后随机抽取5只大鼠, 取腹主动脉组织进行光镜和电镜检查, 有动脉内膜增厚或斑块形成提示造模成功。然后将剩余的30只大鼠随机分为他汀组、模型组、柴白温胆汤组。按照“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”, 他汀组给予阿托伐他汀0.6mg/(kg·d)加10mL的生理盐水灌胃, 柴白温胆汤组给予16g/(kg·d)柴白温

胆汤灌胃, 对照组和模型组每天给予等体积的生理盐水灌胃, 共给药4周, 给药期间所有大鼠自由饮水和普通饲料喂养。

1.4 各指标检测方法 第12周末处死所有大鼠, 处死前禁食不禁饮12h, 经腹腔注射10%水合氯醛溶液(3 mL/kg)麻醉, 然后于腹主动脉末端取血10 mL, 6 000 r/min离心20 min后取上层血清, -70 ℃保存, 待测TC、TG、LDL-C、HDL-C、NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-1β、hs-CRP、SOD、MDA的水平。TC、TG、LDL-C、HDL-C采用日立-7180型全自动生化分析仪进行检测; NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-1β、hs-CRP、SOD、GSH-Px、CAT、MDA、ROS用ELISA法进行检测。

1.5 统计学方法 用SPSS24.0软件进行数据分析, 计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用单因素方差分析法检验, 两组间比较采用LSD-*t*检验, 计数资料采用 χ^2 检验, 等级资料采用Mann-Whitney秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 各组大鼠TC、TG、HDL-C、LDL-C检测结果比较 见表1。与对照组比较, 模型组血清TC、TG、LDL-C水平明显升高($P < 0.05$), HDL-C明显降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 柴白温胆汤组和他汀组血清TC、TG、LDL-C水平明显降低($P < 0.05$), HDL-C水平明显升高($P < 0.05$); 与他汀组比较, 柴白温胆汤组血清TC、TG、LDL-C、HDL-C差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-1β、hs-CRP检测

结果比较 见表2。与对照组比较, 模型组血清NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-1β、hs-CRP水平明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 柴白温胆汤组和他汀组血清NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-1β、hs-CRP水平明显降低($P < 0.05$); 与他汀组比较, 柴白温胆汤组血清NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-1β、hs-CRP水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠SOD、GSH-Px、CAT、MDA、ROS检测结果比较 见表3。与对照组比较, 模型组血清SOD、GSH-Px、CAT水平明显降低($P < 0.05$), MDA、ROS水平明显升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 柴白温胆汤组和他汀组血清SOD、GSH-Px、CAT水平明显升高($P < 0.05$), MDA、ROS水平明显降低($P < 0.05$); 与他汀组比较, 柴白温胆汤组血清各指标水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表1 各组大鼠TC、TG、HDL-C、LDL-C检测

组别	鼠数	结果比较 $(\bar{x} \pm s)$			
		TC	TG	HDL-C	LDL-C
对照组	10	1.26±0.29	0.68±0.21	1.07±0.36	1.13±0.16
模型组	10	4.16±0.24 ^①	2.03±0.64 ^①	0.41±0.25 ^①	3.42±0.92 ^①
他汀组	10	2.54±0.39 ^②	0.95±0.28 ^②	0.81±0.30 ^②	2.39±0.72 ^②
柴白温胆汤组	10	2.67±0.51 ^{②③}	1.03±0.27 ^{②③}	0.78±0.24 ^{②③}	2.46±0.57 ^{②③}

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$; 与他汀组比较, ③ $P > 0.05$

表2 各组大鼠NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-1β、hs-CRP检测结果比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	鼠数	NF-κB(ng/mL)	TNF-α(μg/L)	IL-6(ng/mL)	IL-1β(ng/mL)	hs-CRP(mg/L)
对照组	10	26.39±6.58	1.65±0.16	65.25±16.98	86.68±26.98	3.52±0.65
模型组	10	68.62±12.68 ^①	4.68±0.36 ^①	116.95±35.27 ^①	186.85±45.83 ^①	13.60±1.65 ^①
他汀组	10	46.36±9.57 ^②	2.31±0.41 ^②	85.63±32.85 ^②	119.65±46.98 ^②	6.63±0.52 ^②
柴白温胆汤组	10	44.27±11.36 ^{②③}	2.36±0.32 ^{②③}	78.96±29.85 ^{②③}	126.62±46.85 ^{②③}	7.06±2.62 ^{②③}

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$; 与他汀组比较, ③ $P > 0.05$

表3 各组大鼠SOD、GSH-Px、CAT、MDA、ROS检测结果比较 $(\bar{x} \pm s)$

组别	鼠数	SOD(U/mL)	GSH-Px(U/mL)	CAT(U/mL)	MDA(mmol/mL)	ROS(U/mL)
对照组	10	468.65±42.68	124.52±124.52	18.62±12.65	10.68±2.68	196.25±45.68
模型组	10	185.65±59.74 ^①	46.65±25.68 ^①	5.68±1.06 ^①	35.42±8.65 ^①	354.69±124.58 ^①
他汀组	10	296.85±105.62 ^②	86.97±26.54 ^②	11.52±2.68 ^②	18.24±5.49 ^②	256.72±136.45 ^②
柴白温胆汤组	10	306.87±134.58 ^{②③}	95.63±225.63 ^{②③}	12.16±3.17 ^{②③}	17.81±6.43 ^{②③}	265.84±108.79 ^{②③}

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$; 与他汀组比较, ③ $P > 0.05$

3 讨论

目前关于AS形成机制的经典学说是脂质代谢, 但是炎症反应和氧化应激反应在AS的发生和发展中起到了重要的作用^[9]。炎症反应主要表现为NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-1β、hs-CRP等炎症因子表达异常。NF-κB是一种多向转录调节作用的蛋白质, 可以通过刺激单核巨噬细胞和淋巴细胞等过度分泌TNF-α、IL-6、IL-1β、hs-CRP, 增强炎症反应, 诱导平

滑肌细胞凋亡, 最终导致AS^[10]。TNF-α可通过促进LDL氧化修饰为ox-LDL, 刺激单核细胞表达IL-6、IL-1β、hs-CRP等炎症因子, 抑制内皮细胞增殖, 诱导细胞间黏附分子表达, 促进血栓形成, 抑制脂质溶解, 使其沉积于血管壁, 促进血管损伤和AS形成^[11]。IL-6可促进T淋巴细胞和B淋巴细胞分泌炎症因子, 促进中性粒细胞聚集在血管内壁, 从而激活组织蛋白酶, 促进细胞外基质和基底膜的降解, 导致斑块破裂^[12]。Nishida M

等^[13]发现 IL-6 与动脉内膜增厚和弹性减弱有一定的相关性。IL-1 β 可以通过促进内皮细胞间黏附分子的表达,促进平滑肌细胞增生和迁移,促进斑块形成^[14]。CRP 是一种非特异性炎症因子,可以促进炎症因子表达,并迁移至受损的血管内皮,促进平滑肌细胞增生,导致动脉粥样斑块形成^[15]。TC、TG、LDL-C 可刺激 IL-6、IL-1 β 等炎症因子表达,促进细胞间黏附因子分泌,导致斑块形成^[15]。氧化应激反应是机体内参与氧化和抗氧化物质的比例失衡,产生较多的氧自由基,促进细胞凋亡^[16]。氧化应激反应同样参与了 AS 发生、发展的整个过程,MDA 和 ROS 等氧化物质可以通过生成活性氧和 NO 等破坏血管壁的光滑,引起斑块形成和破裂。而 SOD、GSH-Px、CAT 等抗氧化物质有促进 MDA 和 ROS 清除的作用,当其分泌不足时,引起 MDA 和 ROS 过剩,从而引起动脉血管内壁发生氧化损伤^[17]。

AS 属中医学“痰浊”范畴,中医学认为 AS 为本虚标实之病,根在气虚,气滞是 AS 的始动因素,痰浊、瘀血是动脉硬化重要病理产物,也是疾病的中心环节。气为血之帅,气行则血行,气滞则血瘀,气虚则血瘀,血行不畅,聚而成瘀,瘀血阻滞心脉、血管,痹阻不通。脾主运化水湿,肝木乘土,脾气亏虚,脾虚运化失常,水湿代谢异常,聚痰成饮,且岭南地区地处亚热带潮湿地带,外湿困脾,脾不运化,聚痰成饮,痰浊阻滞心脉,痹阻不通。痰浊与瘀血互相胶结,痹阻血管,导致病程缠绵。柴白温胆汤中半夏燥湿化痰,竹茹清热化痰,陈皮理气行滞、燥湿化痰,茯苓健脾利湿、杜绝生痰之源,柴胡疏肝解郁、理气行滞,丹参、川芎活血化瘀,枳壳理气宽中、行气消胀,黄芪健脾益气,白芍、甘草养血柔肝,缓急止痛。综合全方,共奏健脾益气,理气行滞,活血化瘀,祛湿化痰之效。本实验结果提示柴白温胆汤可以通过抑制 NF- κ B、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、hs-CRP、MDA、ROS 的表达,促进 SOD、GSH-Px、CAT 的表达,抑制炎症反应和氧化应激,从而抑制 AS 的进程、防治 AS。

[参考文献]

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等.《中国心血管病报告 2017》概要[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(1): 1-8.
- [2] XI B, LIU F, HAO Y, et al. The growing burden of cardiovascular diseases in China[J]. International Journal of Cardiology, 2014, 174(3): 736-737.
- [3] KNOBLER H, BITZUR R, GAVISH D, et al. Prevention and treatment of atherosclerosis and cardiovascular diseases[J]. Harefuah, 2012, 151(5): 281.
- [4] HERRINGTON W, LACEY B, SHERLIKER P, et al. Epidemiology of Atherosclerosis and the Potential to Reduce the Global Burden of Atherothrombotic Disease [J]. Circulation Research, 2016, 118(4): 535.
- [5] LIBBY P. Inflammation in atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology, 2012, 32(9): 2045-2051.
- [6] LI H, HORKE S, FÖRSTERMANN U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2014, 237(1): 208-219.
- [7] 曹洪涛. 心血管疾病防治的中医药优势[J]. 西部中医药, 2016, 29(10): 139-141.
- [8] 刘炜枫,赵帅,陈伯钧,等. LXR mRNA 在动脉粥样硬化兔中的表达变化[J]. 海南医学, 2016, 27(15): 2413-2415.
- [9] GALKINA E, LEY K. Immune and Inflammatory Mechanisms of Atherosclerosis[J]. Annual Review of Immunology, 2008, 27(1): 165-197.
- [10] KANG L, CHING D, FU S L, et al. MicroRNA-146a suppression of NF- κ B-driven monocyte/macrophage activation and atherosclerosis is regulated by cellular ApoE expression[J]. Angiogenesis, 2015, 17(4): 939.
- [11] SBARSI I, FALCONE C, BOIOCCHI C, et al. Inflammation and atherosclerosis: the role of TNF and TNF receptors polymorphisms in coronary artery disease [J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2007, 20(1): 145-154.
- [12] LEGEIN B, TEMMERMAN L, BIESSEN E A, et al. Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis [J]. Cellular & Molecular Life Sciences, 2013, 70(20): 3847-3869.
- [13] NISHIDA M, MORIYAMA T, ISHII K, et al. Effects of IL-6, adiponectin, CRP and metabolic syndrome on subclinical atherosclerosis [J]. Clinica Chimica Acta, 2007, 384(1-2): 99.
- [14] PAFFEN E, DEMAAT M P. C-reactive protein in atherosclerosis: A causal factor? [J]. Cardiovascular Research, 2006, 71(1): 30-39.
- [15] BRADLEY R L, FISHER F F, MARATOS-FLIER E. Dietary fatty acids differentially regulate production of TNF- α and IL-10 by murine 3T3-L1 adipocytes [J]. Obesity, 2008, 16(5): 938-944.
- [16] FUJIMOTO H, KOBAYASHI H, OHNO M. Age-induced reduction in mitochondrial manganese superoxide dismutase activity and tolerance of macrophages against apoptosis induced by oxidized low density lipoprotein [J]. Circulation Journal, 2010, 74(2): 353-360.
- [17] LI X, ZHAO L, YUE L, et al. Evidence for the protective effects of curcumin against oxyhemoglobin-induced injury in rat cortical neurons [J]. Brain Research Bulletin, 2015, 120: 34-40.

(责任编辑:冯天保,钟志敏)