

五福心脑血管清对实验性早期 AS 大鼠血脂、氧自由基及组织形态学的影响

丁奇峰*, 王珏, 黄晋红, 张茶, 安占军

武警河北省总队医院, 石家庄 050081

摘要: 探讨五福心脑血管清对实验性早期动脉粥样硬化大鼠组织形态学的影响。采用高脂乳剂制备实验性早期动脉粥样硬化大鼠模型, 同时分别采用低、中、高不同剂量的五福心脑血管清(0.31、0.62、1.24 g/kg)以及非诺贝特(20 mg/kg)进行干预, 实验10周后, 检测实验动物血清中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白-胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)、丙二醛(MDA)的含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性, 制备大鼠动脉组织病理切片及超薄切片在光镜及电镜下观察病理变化。结果发现五福心脑血管清不同剂量组给药10周后, 与模型组相比, 其血清的TC、TG、MDA等水平均有显著降低($P < 0.01$), HDL-C水平、SOD活性显著升高($P < 0.05$ 、 0.01)。光镜观察及电镜表明, 给予五福心脑血管清10周后大鼠早期动脉粥样硬化组织损伤明显减轻, 五福心脑血管清中剂量组(0.62 g/kg)变化最为显著。表明五福心脑血管清对实验性早期动脉粥样硬化大鼠具有较好的预防和治疗作用, 其机制可能是通过调节血脂、降低脂肪在动脉壁上的沉积以及清除氧自由基, 抑制脂质过氧化产物的产生有关。

关键词: 五福心脑血管清软胶囊; 动脉粥样硬化; 脂质过氧化; 血脂

中图分类号: R285

文献标识码: A

Effects of WuFu Xinnaoqing on Blood Lipid, Oxygen Free Radical and Histomorphology in Rat Model with Experimental Early Atherosclerosis

DING Qi-feng*, WANG Jue, HUANG Jin-hong, ZHANG Cha, AN Zhan-jun

Hebei Municipal corps Hospital, People's Armed Police Forces of China, Shijiazhuang 050081, China

Abstract: The objective of this study was to discuss the effects of WuFu Xinnaoqing (WFXNQ) on blood lipid, oxygen free radical and histomorphology in rat model with experimental early atherosclerosis. The rat model was induced by feeding lipid emulsion. The experimental rats were then gavaged with low, medium and high doses of WFXNQ (0.31, 0.62 and 1.24 g/kg) and fenofibrate (20 mg/kg) for 10 weeks followed by the detection of the total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), MDA, superoxide dismutase (SOD) activity in rats' serum of each groups. In addition, the tissue slices and super thin slices of rat carotid artery were prepared and observed under light microscopy and electron microscopy for pathological changes. The results showed that compared with model group, the serum TC, TG and MDA Levels of WFXNQ treatment groups were significantly reduced ($P < 0.01$). The HDL-C level, SOD activity of sample groups were significantly higher than those of the model group ($P < 0.05$, 0.01). The light microscopic and electron microscopic observation results showed that the injury of rat tissues in WFXNQ treatment groups were significantly reduced compared with that of control group, in which the medium dosage of WFXNQ treatment group (0.62 g/kg) showed the most significant change. Based on the above results, it was concluded that WFXNQ had preventive and treatment effects on experimental early atherosclerosis by regulating blood fat, lowering fat deposition on artery walls, scavenging oxygen free radicals and inhibiting the generation of lipid peroxidation products.

Key words: WuFu Xinnaoqing; atherosclerosis; lipid peroxidation; blood fat

五福心脑血管清由精制红花油、维生素E、冰片和维生素B6组成, 是一种以中药为主的中西药复合制剂, 具有活血化痰、通经止痛、开窍醒神的功能, 广泛

用于高血压、高血脂、冠状动脉硬化、缺血性脑梗塞、阿尔茨海默病等疾病^[1-4],研究发现其具有降低甘油三酯、胆固醇和低密度脂蛋白,提高高密度脂蛋白的含量,有防治动脉粥样硬化、抑制血小板聚集及改善血液流变学的作用^[5]。但尚未发现其对早期动脉粥样硬化形态学变化方面的研究,本实验通过灌服脂肪乳剂法建立大鼠模型,观察了不同剂量的五福心脑血管清对实验性早期动脉粥样硬化大鼠的血脂、氧自由基及形态学变化的影响,以期在五福心脑血管清更广泛的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试验药物

五福心脑血管清(WuFu Xinnaoqing, WFXNQ)由石家庄神威药业股份有限公司提供(0.908 g/mL,批号11029264),试验时用原液给药,其性状为黄色油状液体。阳性对照药:非诺贝特胶囊购自法国利博福尼制药有限公司,批号1103465,规格为200 mg/粒,临用时用0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制。

1.2 实验动物

健康SD大鼠60只购自河北省实验动物中心,雌雄各半,质量200~250 g,清洁级,合格证号:冀医动管字115259号。

1.3 试剂

胆固醇和3号胆盐,上海楷洋生物技术有限公司生产;丙基硫氧嘧啶,苏州东瑞制药有限公司生产;丙二醇和聚山梨酯-80,国药集团化学试剂有限公司生产;猪油自制;总胆固醇(Total cholesterol, TC)、甘油三酯(Triglyceride, TG)测定试剂盒由北京利德曼生化技术有限公司生产;高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol, HDL-C)测定试剂盒:由上海科华生物工程股份有限公司生产;低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)测定试剂盒由北京柏定生物工程技术有限公司生产;超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)试剂盒,均由南京建成生物工程研究所提供;脂肪乳剂配方^[6]:含猪油15%、胆固醇6%、3号胆盐2%、丙基硫氧嘧啶0.2%、丙二醇20%、聚山梨酯-80 16%。

1.4 仪器

7170-A 全自动化生化分析仪(日本日立公司);7230G 型紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);DK-600A 电热恒温水箱(上海一恒实验

仪器有限公司);LD4-2A 离心机(北京医用离心机厂);H-7500 型透射式电子显微镜、S-3500N 型扫描电子显微镜(日本日立公司);超低温冰箱(日本SANYO公司);HBO 50/AC 型荧光显微镜(德国ZEISS公司);HMIAS-2000 医学图象分析系统(武汉千屏影像技术有限责任公司)。

1.5 方法

1.5.1 动物分组、造模及给药方法^[2]

将SD大鼠适应性喂养1周,使其适应环境。一周后禁食不禁水12 h 眶内采血检测血脂,均为正常者用于实验。根据体重排序,然后随机分为6组,每组10只,依次为正常对照组(简称正常组)、模型组、非诺贝特(20 mg/kg)阳性对照组(简称非诺贝特组)、五福心脑血管清低、中、高(0.31、0.62、1.24 g/kg)剂量组。除正常组外,其余每组上午按时ig高脂乳剂,1 mL/100 g,连续给药10周。第4周末禁食不禁水12h 眶内采血化验以确定高脂模型是否复制成功。于第5周起开始各治疗组,下午ig给予各剂量药物,0.2 mL/100 g。于第10周末次给药后禁食12 h 不禁水,以4%水合氯醛1 mL/100g ip麻醉,腹主动脉取血,检测各项生化指标。

1.5.2 血清生化指标检测

按试剂盒提供的方法分别测定血清TC、TG、HDL-C、LDL-C、SOD和MDA。LDL-C按下述公式计算:LDL = TC - (TG/2.2 + HDL-C)。

1.5.3 组织学观察

10%水合氯醛按30 mg/kg的剂量将大鼠腹腔注射麻醉后,无菌操作,打开腹腔,剥离主动脉,随机取材,以10%福尔马林固定,逐级酒精脱水,石蜡包埋,常规切片,HE染色,光镜下观察并拍照。4%多聚甲醛固定,截取胸主动脉,切成1 mm²大小的小块,2.5%戊二醛固定,酒精梯度脱水,临界点干燥,镀金属膜,日立S-3500N型扫描电子显微镜观察内膜面并拍照。4%多聚甲醛固定,截取胸主动脉,切成1 mm²大小的小块,迅速投入4℃预冷的4%戊二醛固定,1%锇酸后固定,乙醇梯度脱水,环氧树脂包埋,做超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,日立H-7500型透射式电子显微镜观察、拍照^[7]。

1.5.4 统计学分析

所有数据均用SPSS 19.0统计软件包进行处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,资料进行正态性检验;多组计量资料采用one-way ANOVA,方差齐时采用LSD和SNK法,方差不齐时采用Tamhane'

s T2 或 Dunnett's T3 法。P < 0.05 有统计学意义。

2 实验结果

2.1 五福心脑血管清对实验性早期 AS 大鼠血清脂质的影响

五福心脑血管清及非诺贝特连续给药 10 周后,与对

照组比较,模型组大鼠血清 TC、TG 和 LDL-C、HDL-C 显著升高(P < 0.01,表 1)。五福心脑血管清各组及非诺贝特连续给药 10 周后,与模型组相比,大鼠血清 TC、TG、LCL-C 的水平均显著降低(P < 0.01),血清 HDL-C 均显著升高作用(P < 0.05、0.01)。其中以五福心脑血管清中剂量(0.62 g/kg)组作用最佳。

表 1 五福心脑血管清对实验性早期 AS 大鼠血清脂质的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of WFXNQ on serum lipid of rats with early atherosclerosis ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	只(n)	剂量(g/kg) Dosage (g/kg)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)
正常组 Normal groups	10	-	1.13 ± 0.26	0.48 ± 0.12	0.37 ± 0.09	0.69 ± 0.17
模型组 Model groups	9	-	18.30 ± 3.91*	0.85 ± 0.08*	1.45 ± 0.27*	11.13 ± 2.15*
非诺贝特组 Fenofibrate groups	9	0.02	10.58 ± 3.59**	0.42 ± 0.03**	2.49 ± 0.53**	7.56 ± 2.08**
五福心脑血管清低剂量组 WFXNQ low dose	10	0.31	11.78 ± 2.58**	0.54 ± 0.11**	1.98 ± 0.51***	7.31 ± 2.54**
五福心脑血管清中剂量组 WFXNQ medium dose	10	0.62	7.39 ± 1.38**	0.40 ± 0.04**	2.54 ± 0.73**	5.34 ± 0.85**
五福心脑血管清高剂量组 WFXNQ high dose	10	1.24	9.22 ± 1.93**	0.47 ± 0.16**	2.06 ± 0.56***	7.24 ± 1.12**

注:与正常对照组比较,*P < 0.01,**P < 0.05;与模型组比较,**P < 0.01,***P < 0.05。

Note:compare with normal group,*P < 0.01,**P < 0.05;compare with model group,**P < 0.01,***P < 0.05.

2.2 五福心脑血管清对实验性早期 AS 大鼠血清 MDA、SOD 的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清中 SOD 活性明显降低(P < 0.01),MDA 显著升高(P < 0.01)(表 2)。五福心脑血管清连续给药 10 周后,五福心脑血管清各

剂量组及非诺贝特组均显著降低 AS 大鼠血清中 MDA 水平(P < 0.01),升高 SOD 活性(P < 0.01)。五福心脑血管清各剂量组中以中剂量(0.62 g/kg)组作用尤为显著。

表 2 五福心脑血管清对实验性早期 AS 大鼠血清 MDA、SOD 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of WFXNQ on SOD and MDA of rats with early atherosclerosis ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	只(n)	剂量 Dosage (g/kg)	SOD (U/mL)	MDA (noml/mL)
正常组 Normal groups	10	-	247.25 ± 49.44	0.69 ± 0.24
模型组 Model groups	9	-	175.31 ± 44.20*	3.41 ± 1.14*
非诺贝特组 Fenofibrate groups	9	0.02	2528.90 ± 34.14**	1.65 ± 0.75**
五福心脑血管清低剂量组 WFXNQ low dose	10	0.31	235.41 ± 45.83**	2.53 ± 0.72**
五福心脑血管清中剂量组 WFXNQ medium dose	10	0.62	279.01 ± 45.41**	1.58 ± 0.41**
五福心脑血管清高剂量组 WFXNQ high dose	10	1.24	238.70 ± 44.38**	2.34 ± 0.72**

注:与正常对照组比较,*P < 0.01;与模型组比较,**P < 0.01。

Note:compare with normal group,*P < 0.01;compare with model group,**P < 0.01.

2.3 AS 形体学变化

2.3.1 动物生存情况

正常组大鼠食欲旺盛,眼睛有神,反应敏捷,被毛紧披有光泽,肌肉丰满,健康有力,身无伤痕,尾不弯曲,天然孔无分泌物,无畸形,粪便呈麦粒状,体重平均增加 200 g。其他 5 组实验开始时有厌食,一周后恢复正常,反应敏捷,被毛有光泽,饮水、便质、尿量正常。实验第 6 周鼠尾均有不同程度的结节形成,凸出皮肤,有的甚至溃破感染,但模型组较重,模

型组多数鼠头部及臀部出现脱毛,被毛竖起,弯腰弓背现象。第 8 周后模型组、非诺贝特组各死亡 1 只,死前有瘫痪和抽搐现象发生,可能与动脉粥样硬化,心脑血管疾病有关。体重平均增加 100 g。

2.3.2 光镜观察结果

光镜观察结果见图 1。正常组动脉内膜光滑完整,单层内皮细胞连接紧密,无脂质条纹或纤维斑块,内膜下间隙较小,模型组血管壁明显增厚,内皮细胞广泛损伤脱落,脂质沉积,底层胶原纤维暴露,

内皮下间隙增宽,五福心脑清组中剂量组内膜基本完整,单层内皮细胞连接尚紧密,脂质条纹或纤维斑块与模型组相比明显减少,五福心脑清组低、高剂量

组、非诺贝特组动脉内膜增厚、内皮细胞损伤及脂质沉积等病理改变均较模型组减轻,可见 EC 缺失,但明显好于模型组。

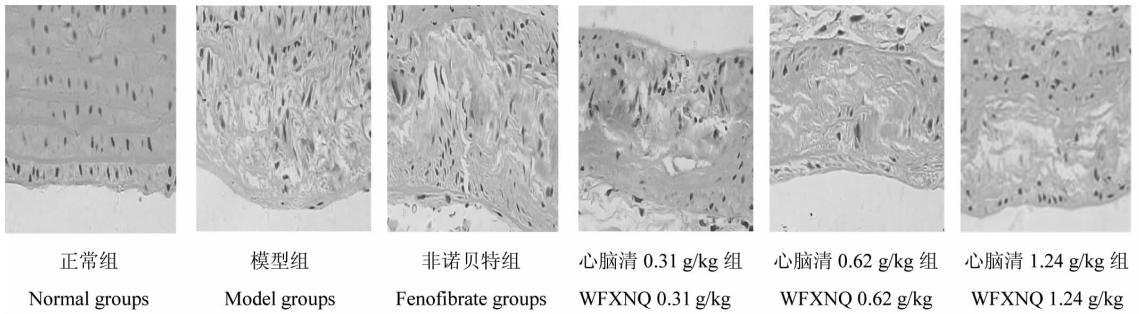


图 1 动脉粥样硬化组织光镜观察(HE × 400)

Fig. 1 Light microscopy of endothelium of rats in different groups (HE × 400)

注:A 泡沫细胞;B 钙盐沉积;C 胆固醇结晶;D 内皮细胞脱落;E 炎性细胞浸润

Note: A. foam cell; B. calcium salt precipitate; C. cholesterol crystal; D. EC ablate; E. inflammatory cell infiltrate

2.3.3 EC 扫描电镜所见

正常组 EC 界限清楚,排列规整,连接紧密,细胞呈长梭形,核区饱满,膜表面结构清晰,可见典型微绒毛(图 2)。模型组 EC 形态明显异常,部分呈收缩状态,体积缩小,细胞间隙增大或出现深大裂隙,EC 胞膜表面呈大小不等的虫蚀状、火山口状缺

损,洞内嵌有红细胞,白细胞,并可见大片 EC 崩解,甚至脱落仅余残基,区内有血小板、血细胞和细胞碎屑纤维素等附着。五福心脑清组中剂量组 EC 基本完整,排列较整齐,偶见 EC 缺损,其余各治疗组 EC 部分缺损,细胞膜部分破坏,呈小洞状,但损伤明显轻于模型组。

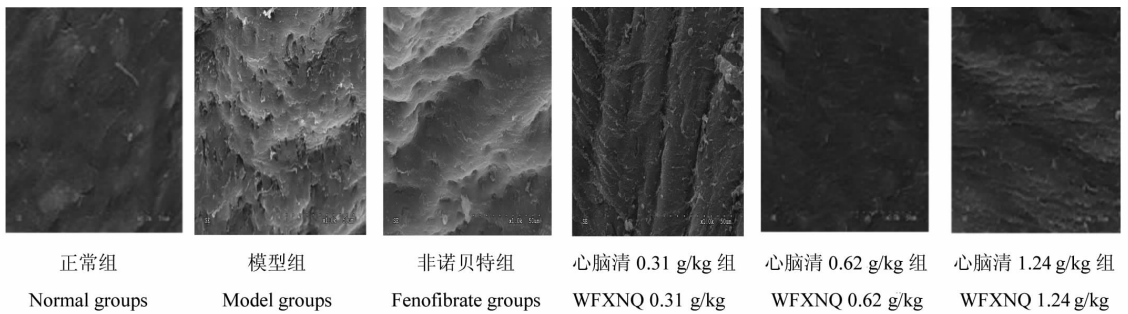


图 2 动脉粥样硬化组织扫描电镜观察(SEM × 1000)

Fig. 2 The scanning electron microscopy of endothelium of rats in different groups (SEM × 1000)

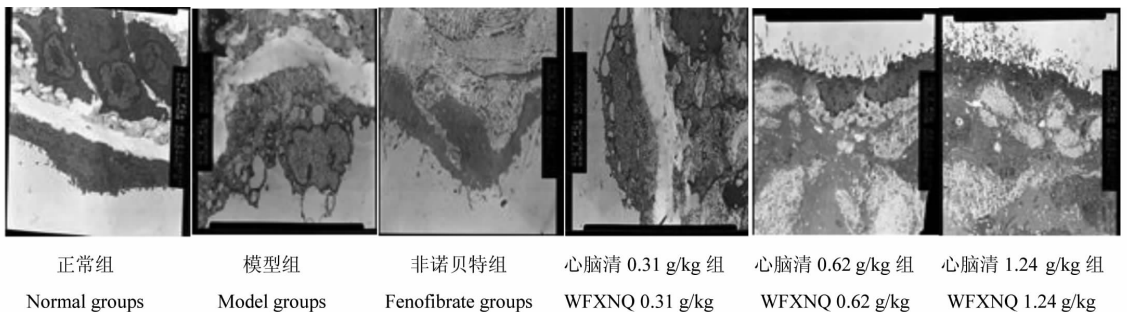


图 3 动脉粥样硬化组织透射电镜观察(TEM × 4000)

Fig. 3 The transmission electron microscopy of endothelium of rats in different groups (TEM × 4000)

2.3.4 EC 透射电镜观察

正常组 EC 完整,细胞间连接紧密,胞质互相覆盖,模型组 EC 间连接处胞质分离,变直、变宽,出现较大间隙,并可见 MC 黏附于内皮表面或伸出伪足潜入内皮间隙、内皮下,大部分 EC 残缺、脱落,表面有血小板黏附(图 3)。各治疗组可见 EC 较完整,覆盖于内膜表面,细胞连接较好,MC 黏附减少。其中五福心脑血管清组中剂量组损伤最轻。

3 讨论

AS 是动脉内膜的脂质、血液成分的沉积,平滑肌细胞及胶原纤维增生,伴有坏死及钙化等不同程度病变的一类慢性进行性病理过程,在动脉内膜上出现肉眼可见的不同特点的形态学改变,即脂质斑纹、纤维斑块及粥样灶形成等。而这些典型病变的形成,高胆固醇血症是 AS 形成的独立危险因素之一^[8],因此有效的降低血胆固醇是抗 AS 研究的关键所在。

非诺贝特属苯氧芳酸类调脂药物,通过激活过氧化物酶增殖体活化受体 α (peroxisome proliferator activated receptor- α , PPAR- α),刺激脂蛋白脂酶 (lipoproteinlipase, LPL)、载脂蛋白 A I (apolipoprotein AI, apo AI)、载脂蛋白 A II (apoA II)、载脂蛋白 A V (apoA V) 基因的表达,增强 LPL 活性,去除血浆中富含 TG 的脂蛋白,从而降低 TG 和升高 HDL-C 水平,促进胆固醇的逆向转运,并使 LDL 亚型由小而密颗粒向大而疏颗粒转变。此外,还具有抗炎、降低纤维蛋白原、改善内皮功能、改善胰岛素敏感性等调脂以外的抗动脉粥样硬化作用。但长期服用此类药物,具有潜在的肝、肾功能损害、肌病发生的风险^[9]。

传统中医很难找到与动脉粥样硬化及高脂血症等相对应的病名,然与动脉粥样硬化及高脂血症相关性疾病(如冠心病)有关的病名却不鲜见,如胸痹、心痹、心痛、心悸、痰证等。究其病机与气机阻滞,血行不畅有关。治当理气活血化瘀为先。五福心脑血管清由精制红花油、维生素 E、冰片和维生素 B6 组成,具有活血化瘀、通经止痛、开窍醒神的功能。现代药理学研究发现^[5],红花油含有多种人体必需不饱和脂肪酸,可以降低胆固醇、与胆固醇结合,从而减少胆固醇在血管壁的沉积,有效防治高血压、高脂血症。红花引经破血,治疗血郁、血积,为血证专药^[10]。冰片芳香开窍、醒神,能增强血脑屏障的通

透性,治疗动脉粥样硬化等,中医认为,冰片“独行则势弱,佐使则有功”,且可“芳香走窜,引药上行”^[11]。维生素 B6 保护血管内皮细胞,改善循环,抗动脉血管壁坏死、脱落,防止血栓形成,预防动脉粥样硬化。维生素 E 可以保护维生素 A、维生素 C 及脂肪酸免遭破坏,清除氧自由基,清除、防止活性氧的合成和蓄积,阻断脂质过氧化的连锁反应,保护细胞免受毒害^[1]。且目前尚未发现其明显的毒副作用。

本实验通过饲喂高脂高胆固醇饮食复制早期 AS 模型,结果发现大鼠血清 TC、TG、LDL、MDA 升高 ($P < 0.01$), HDL 亦明显升高 ($P < 0.05$), 此与文献^[12]报道不符,其机理不详,有待进一步研究。SOD 活性显著下降 ($P < 0.01$), 给予五福心脑血管清和非诺贝特治疗后,TC、TG、LDL、MDA 含量较模型组明显降低, HDL 含量、SOD 活性显著升高 ($P < 0.01$), 五福心脑血管清各级量组与非诺贝特比较,五福心脑血管清中剂量组 (0.62 g/kg) 优于非诺贝特治疗组 ($P < 0.05$), 其他两组与非诺贝特组无统计学差异 ($P > 0.05$)。结果证实五福心脑血管清可从降脂途径减少 EC 的损伤因素,减轻氧自由基损伤,从而起到拮抗 AS 作用。

本实验观察到模型组主动脉,血管弹性差,内膜光泽度下降,光镜下血管 EC 部分缺失,内膜表面大量 MC 黏附,扫描电镜显示模型组 EC 崩解,甚至脱落,呈大小不等虫蚀状、火山口状或仅余大片残基,区内有血小板、血细胞和细胞碎屑纤维素等附着,透射电镜下 EC 连接处胞质分离,变直、变宽,间隙增大甚至断裂,MC 黏附于内皮表面或伸出伪足潜入。五福心脑血管清和非诺贝特治疗后大鼠 AS 血管 EC 的损伤明显减轻,AS 病变的形成受抑,其中以五福心脑血管清中剂量组 (0.62 g/kg) 尤为明显,动脉内膜形态学改变的观察结果更有力的佐证了五福心脑血管清的抗 AS、保护 EC 的作用。其分子生物学作用机制有待进一步的研究。

参考文献

- 1 Wang YL (王彦礼), Wu YH (伍迎红), Xiong YL (熊玉兰), et al. Therapeutic effect of WuFu Xinnaoqing rats with focal cerebral infarction. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2005, 11(3): 35-36.