

血液再灌注后,部分动物或患者心肌细胞功能代谢障碍及结构破坏反而加重,发生了缺血再灌注损伤。再灌注过程中氧自由基大量生成是造成这种损伤的重要原因之一。另外,缺血及再灌注过程中无氧酵解产物乳酸增加,造成的心肌组织细胞酸中毒也是导致缺血再灌注损伤的原因。附子生物碱、干姜挥发油及甘草酸粗品都可不同程度地提高心肌氧自由基清除剂 SOD 活性,降低心肌氧自由基反应产物 MDA 含量,并可减少心肌无氧酵解产物乳酸的生成。3 种有效成分临床极量组合的疗效最佳。无论对于心肌氧自由基损伤还是无氧酵解的疗效,附子都是处方中的关键因素。干姜挥发油对无氧酵解的疗效起较重要作用而甘草酸粗品对氧自由基损伤的疗效起较重要作用。说明附子生物碱是四逆汤有效成分组合

中的关键因素,干姜挥发油和甘草酸粗品也是组方中不可或缺的因素。这种有效成分的组合特性从另一侧面体现了中药处方配伍的科学性以及治疗疾病的多靶点的特性。通过四逆汤组成方药有效成分的提取,可以减少其毒副作用,从而增加临床治疗的有效剂量,并为将其制成缓释剂奠定基础。

参考文献:

- [1] 吴伟康,苏建文,林曙光,等. 四逆汤防治 PTCA 术后再灌注损伤的作用机制及中医辨证分型的临床研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(1): 23-26.
- [2] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用 [M]. 北京: 学苑出版社, 1998.
- [3] 吴伟康,侯灿,罗汉川,等. 垂体后叶素性心肌缺血模型再探 [J]. 中国病理生理杂志, 1993, 9(2): 124-127.
- [4] 黄辉,吴伟康,陈建萍,等. 新型缺血再灌注模式诱导小鼠心肌细胞凋亡 [J]. 中国心血管杂志, 1999, 4(3): 159-161.

调肝导浊中药对家兔实验性动脉粥样硬化脂质代谢的影响

金 华,陆一竹,陈 静,范英昌*
(天津中医学院,天津 300193)

摘要: 目的 观察调肝导浊中药对家兔实验性动脉粥样硬化 (AS) 血 ApoB 含量、动脉硬化指数 (AI) 及体外培养大鼠肝细胞膜低密度脂蛋白 (LDL) 受体的影响,探讨调肝导浊中药防治 AS 的作用机制。方法 高胆固醇饮食饲喂家兔造成 AS 模型,并体外培养大鼠肝细胞,原位杂交检测肝细胞膜 LDL 受体 mRNA 表达。观察药物对 ApoB 含量、AI 及 LDL 受体的影响。结果 (1) 调肝导浊中药可有效降低血清 ApoB 含量,降低 AI,与模型组比较具有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。 (2) 调肝导浊中药对 LDL 受体途径具有良好调节作用。结论 调肝导浊中药对于 AS 的防治作用与其对脂蛋白及载脂蛋白的调节作用密不可分。

关键词: 调肝导浊;动脉硬化指数;载脂蛋白;动脉粥样硬化;低密度脂蛋白受体

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)04-0336-03

Effect of Chinese drug TIAOGAN DAOZHUO* on lipid metabolism of experimental atherosclerosis in rabbit

JIN Hua, LU Yi-zhu, CHEN Jing, FAN Ying-chang
(Tianjin College of TCM, Tianjin 300193, China)

Key words TIAOGAN DAOZHUO; atherogenic index; apolipoprotein; atherosclerosis; low density lipoprotein acceptor

* TIAOGAN DAOZHUO is a Chinese herb prescription with the function of regulating the disorder of *qi* and removing turbid *qi*.

高脂血症是动脉粥样硬化 (AS) 的原因已被确认,其中血浆胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白 (LDL) 过高均为 AS 的危险因子,而高密度脂蛋白 (HDL) 则对其具有防治作用。我们采用实验性 AS

家兔模型,观察调肝导浊中药对载脂蛋白 (Apo) 含量及动脉硬化指数 (AI) 的影响;并体外培养大鼠肝细胞,原位杂交检测肝细胞膜 LDL 受体 mRNA 表达。

* 收稿日期: 2001-08-29
基金项目: 天津市自然科学基金资助课题 (No. 003607911)

1 材料与方法

1.1 实验药品及试剂: 胆固醇 (购自天津化学试剂批发公司); 洛伐他汀 (购自天津市协和和生物医学工程开发公司协和第一药店); 调肝导浊中药 (购自天津中医学院中医研究所), 由炙首乌、柴胡、草决明、泽泻、丹参、荷叶、姜黄组成, 水提、醇提, 制成浸膏备用; ApoB检测试剂盒 (购自上海玉兰生物技术研究所以)。胎牛血清: 购自中国医学科学院血液病研究所。DMEM-F12培养基 (GIBCO公司产品)。0.03% IV型胶原酶 (Sigma产品, 购自天象人生物制品公司)。LDL受体原位杂交检测试剂盒 (购自博士德生物工程有限公司)。DAB显色试剂盒 (购自博士德生物工程有限公司)。

1.2 动物及分组

1.2.1 预防实验: 健康日本大耳白家兔 48只, 雌雄各半, 体重 (2.63 ± 0.22) kg (由天津中医学院医学动物中心提供)。随机分为 5组: 正常组、模型组、低剂量中药组、高剂量中药组、西药组。正常组: 每日基础饲料喂养。模型组: 按每只 1 g/d 给胆固醇, 均匀拌于普通饲料中制成高脂颗粒饲料喂养。低、高剂量中药组: 自造模日起同时给药, 按 16.5, 33.0 g生药/kg $\cdot$ d (成人用量 10, 20倍), 制成药物颗粒饲料。西药组: 自造模日起同时给药洛伐他汀, 按每只 2.5 mg/d (成人用量 6倍), 拌于普通饲料中饲喂。均自由进水, 12周结束实验时各组动物心脏取血, 进行指标检测。

1.2.2 治疗实验: 健康日本大耳白家兔 32只, 雌雄各半, 体重 (2.63 ± 0.22) kg (由天津中医学院医学动物中心提供)。随机分为 4组: 正常组、模型组、中药组、西药组。除正常组基础饲料喂养外, 其余各组均给胆固醇饲料 (方法同 1.2.1), 10周后, 模型组继续高胆固醇饮食, 中药组按 1.2.1低剂量中药组给药, 西药组同 1.2.1方法给药。6周后, 各组动物心脏取血, 进行指标检测。

1.3 细胞培养

1.3.1 免载药血清制备: 日本大耳白家兔 5只, 雌雄不限, 体重 2~2.5 kg 把 16.5 g生药/kg $\cdot$ d (合成人用量 10倍) 制成的调肝导浊中药煎剂加入基础饲料饲养 6d 无菌条件心脏取血, 制备血清。

1.3.2 固定液配制: 在 0.1 mol/L PBS中, 按 4% 比例加入多聚甲醛, 并加入 1/1 000 DEPC (焦碳酸二乙酯)。

1.3.3 肝细胞培养及分组: 健康 Wistar 大鼠, 雄性, 80~100 g (购自天津医学实验动物研究所) 麻

醉后, 无菌打开腹腔, 行门静脉及下腔静脉插管。门静脉灌注 D-Hanks 液约 150 mL 后, 换用 37 $^{\circ}$ C 0.03% IV型胶原酶灌注 60~80 mL, 迅速取下肝脏, 除去被膜及结缔组织, 把肝脏剪成 1 mm³左右的小块, 贴壁培养在玻片上。少量血清 37 $^{\circ}$ C 孵育 2~3 h 后, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM-F12培养液, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱培养, 台盼蓝染色计算肝细胞存活率 95% 以上。待细胞呈现分布均匀而密布的单细胞层, 将肝细胞随机分为 6组: 正常组: 继用正常培养基培养。中药组: 按每 100 mL 培养液 30 μ L 无菌调肝导浊中药药液。载药血清组 (基础培养液: 胎牛血清: 免载药血清 = 80: 15: 5)。OX-LDL培养组: 按每 100 mL 培养液加入 5 mg OX-LDL (购自中国协和医学科学院基础研究所)。OX-LDL加中药组: 按每 100 mL OX-LDL培养液 30 μ L 无菌调肝导浊中药药液。OX-LDL加载药血清组 (OX-LDL培养液: 胎牛血清: 载药血清 = 80: 15: 5)。

1.3.4 细胞处理及原位杂交实验: 培养 48 h 后取出玻片, 0.1 mol/L PBS冲洗, 固定液固定 30 min, 蒸馏水充分洗涤。滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶, 37 $^{\circ}$ C 预杂交 4h, 加杂交液 37 $^{\circ}$ C 过夜。次日, 滴加封闭液、生物素化鼠抗地高辛工作液、SABC工作液和生物素化过氧化物酶, DAB显色。苏木素复染核, 水洗, 脱水, 透明, 封片。10 $\times$ 40倍镜下以目镜测微网的一个大网格为单位面积, 计数细胞染色阳性率, 每张玻片计数 10个视野, 取均值。

1.4 指标测定

1.4.1 免疫比浊法 (全自动单试剂法) 测定血 ApoB含量。

1.4.2 原位杂交检测肝细胞膜 LDL受体 mRNA表达。

1.5 统计学处理: 采用 SPSS9.0软件包进行方差分析; 组间对照, F 检验, q 检验。

2 结果

2.1 对动脉硬化指数的影响: 见表 1, 2 结果显示, 模型组动脉硬化指数 AI [总胆固醇/高密度脂蛋白-胆固醇, (TC/HDL-C)] 与正常组相比, 具有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。给药后, AI较模型组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。但在预防实验中, 各给药组无明显差异。治疗实验中, 中药组与西药组相比, 具有非常显著性差异 ($P < 0.01$)。

2.2 对血清 ApoB含量的影响: 见表 3 结果表明, 模型组 ApoB含量明显高于正常组 ($P < 0.01$) 用

药后 , ApoB含量较模型组明显降低 ($P < 0. 01$) 两种不同中药剂量相比 ,以低剂量中药组作用为优 ($P < 0. 05$) .

表 1 调肝导浊中药对预防实验家兔 AS模型动脉硬化指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g /kg)	例数	AI
正常	—	10	3. 59± 0. 30 [*]
模型	—	9	14. 32± 5. 05 [#]
中药	16. 5	10	7. 89± 2. 84 [*]
	33	9	9. 14± 5. 02 [*]
洛伐他汀	0. 01	10	6. 98± 2. 41 [*]

与正常对照组相比: [#] $P < 0. 01$
与模型组相比: ^{*} $P < 0. 05$ ^{**} $P < 0. 01$

表 2 调肝导浊中药对治疗实验家兔 AS模型动脉硬化指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g /kg)	例数	AI
正常	—	10	3. 59± 0. 30 [*]
模型	—	9	14. 32± 5. 05 [#]
中药	16. 5	6	3. 27± 0. 15 [*] ▲▲
洛伐他汀	0. 01	7	3. 84± 0. 54 [*]

与正常对照组相比: [#] $P < 0. 01$; 与模型组相比: ^{**} $P < 0. 01$;
与西药组相比: ▲▲ $P < 0. 01$

表 3 调肝导浊中药对预防实验家兔 AS模型血清 ApoB含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (g /kg)	例数	ApoB (mg /L)
正常	—	8	133. 5± 25. 0 [*]
模型	—	9	1 005. 5± 303. 3 [#]
中药	16. 5	7	370. 4± 107. 1 ^{##} ▲
	33	8	593. 5± 131. 3 ^{##}
洛伐他汀	0. 01	7	444. 7± 116. 0 ^{##}

与正常对照组相比: [#] $P < 0. 01$; 与模型组相比: ^{**} $P < 0. 01$;
与高剂量中药组相比: ▲ $P < 0. 05$

2.3 细胞 LDL受体阳性率的变化: 见表 4 LDL受体阳性表达在细胞浆,可见胞浆黄染 结果显示, OX-LDL培养组 LDL受体阳性率明显低于正常培养组 ($P < 0. 01$) . 给药后 LDL受体阳性表达率明显升高 ($P < 0. 05$ 或 $P < 0. 01$) . 提示调肝导浊中药具有升高 LDL受体的作用,在调控脂质代谢上,具有重要意义.

表 4 LDL受体阳性细胞率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	LDL受体 (%)
正常培养	9	0. 29± 0. 07 [*]
中药培养	7	0. 44± 0. 06 ^{##}
载药血清	8	0. 40± 0. 10 ^{##}
OX-LDL培养	8	0. 06± 0. 02 [#]
OX-LDL加中药	9	0. 39± 0. 08 ^{##}
OX-LDL加载药血清	8	0. 38± 0. 09 ^{**}

与正常对照组相比: [#] $P < 0. 05$ ^{##} $P < 0. 01$
与 OX-LDL培养组比较: ^{**} $P < 0. 01$

3 讨论

载脂蛋白不仅是脂类运输的携带物,而且可以维持脂蛋白结构,调节脂蛋白转化的关键酶活性,并作为配基与相应受体结合^[1]. ApoB是受体结合 LDL的识别标志,在 LDL代谢及 AS的形成中起着极为重要的作用. ApoB与冠心病患病率呈正相关. 我们在对 Apo进行分析后,发现调肝导浊中药对 ApoB有明显良性调节作用,提示该中药对脂质代谢的调整与对 Apo的调节效应密不可分.

正常情况下,细胞 LDL受体的数量决定血循环中 LDL被清除的速度. 细胞内胆固醇含量的多少,反馈地控制着 LDL受体的合成^[2]. 当 LDL受体由于某种原因受损或发生缺陷时,脂质可通过受损的 LDL受体途径导致细胞内的脂质聚集,促使 AS病变发生. 本实验证实,当给予细胞外源胆固醇时, LDL受体活性下降,这可能由于肝细胞在胆固醇浓度增高的培养液环境中细胞内胆固醇负荷增加,使 LDL受体基因反馈性转录减少,膜受体数目减少,从而使细胞对 LDL的摄取减少,以免胆固醇过多积聚在细胞内. 这是一种有效的基因水平调节,其更详细的分子机制正在研究中. 我们应用调肝导浊中药,观察体外培养肝细胞膜 LDL受体 mRNA水平,发现肝细胞膜 LDL受体水平增加不仅超过未用药的高脂血清培养组,而且高于正常组,中药的作用强于高脂负荷引起的负反馈调节. 提示调肝导浊中药可能直接作用于肝细胞 LDL受体基因或影响基因表达某个环节而使转录增加. 我们推测,可能通过诱导肝细胞 LDL受体基因表达而降血脂.

我们根据中医基础理论及大量临床实践,提出在 AS病变中存在着“气机壅滞,瘀浊阻滞,阴血亏虚”的病机^[3],采用调肝导浊中药复方. 重用炙首乌补益精血;柴胡疏肝理气;草决明、泽泻利水渗湿;重用丹参活血祛瘀,以通为补;姜黄破血行气. 调肝导浊复方疏养并调,体用并治,活血化瘀兼以泄浊,扶正与祛邪并重,相辅相成而达到降粘祛脂、防治 AS之效.

参考文献:

[1] 钟毅,朱秉匡,郑仕富. 益寿调脂片抗高脂血症及动脉粥样硬化的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(10): 616-618.
[2] Brown M S, Goldstein J L. A receptor-mediated pathway for homeostasis [J]. Science, 1986, 232: 34.
[3] 刘彦珠,张侠,郭维琴. 中医脏腑学说与高脂血症[J]. 北京中医药大学学报, 1996, 19(6): 16-18.