

彝药塔若散干预高脂血症金黄地鼠早期动脉粥样硬化的药效学研究

张娜, 李林森, 李志勇*

中央民族大学 中国少数民族传统医学国家民委-教育部重点实验室, 北京 100081

摘要: **目的** 探讨彝药塔若散水提液对早期动脉粥样硬化金黄地鼠的影响。**方法** 金黄地鼠在高脂饲料喂饲的基础上, ip 维生素 D₃ 诱导早期动脉粥样硬化模型。造模 9 周后, 将早期动脉粥样硬化大鼠分为模型组、辛伐他汀 (4.2 mg/kg) 阳性对照组、塔若散水提液高和低剂量 (生药 16.8、2.1 g/kg) 组, 每天 ig 给药 1 次, 连续给药 11 周, 另设对照组。给药结束后检测金黄地鼠血清总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平以及白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 和基质金属蛋白酶组织抑制因子-1 (TIMP-1) 的量; HE 染色法观察颈总动脉组织形态学的变化; 计算肝脏指数。**结果** 与模型组比较, 各给药组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平以及 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9 的量均不同程度地降低, TIMP-1 的量升高, 颈总动脉和肝脏的病理变化均得到不同程度的改善。**结论** 塔若散对早期动脉粥样硬化具有一定的治疗作用, 其机制可能与调节血脂水平和血清中炎症因子以及协调 MMP-9/TIMP-1 的失衡有关。

关键词: 塔若散; 动脉粥样硬化; 调血脂; 炎症因子; MMP-9; TIMP-1

中图分类号: R972.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2013)23-3359-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.23.018

Pharmacodynamics of Yi Medicine Taruosan on prophase atherosclerosis in golden hamster with hyperlipidemia

ZHANG Na, LI Lin-sen, LI Zhi-yong

State Nationalities Affairs Commission and Department of Educational Key Laboratory of Minority Traditional Medicine, MINZU University of China, Beijing 100081, China

Abstract: **Objective** To observe the effect of water extract from Yi Medicine Taruosan (a prescription of powder) on prophase atherosclerosis in golden hamster. **Methods** The golden hamsters were injected with VD₃, while fed with high cholesterol diet. After nine weeks, the models were established successfully. The golden hamsters were divided into model, Simvastatin (4.2 mg/kg), and high- and low-dose (16.8 and 2.1 g/kg) Taruosan water extract groups. The animals were ig administered once daily for 11 weeks, and the animals in the control group were not administered. After administration, the levels of total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and the contents of interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and tissue-inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) were analyzed. Carotid histomorphological changes were observed by HE staining. Hepatic lesions were evaluated by liver index. **Results** Compared with the model group, the levels of TC, TG, LDL-C, IL-1 β , TNF- α , and MMP-9 were reduced, the level of TIMP-1 increased, and the carotid artery and hepatic pathological changes were improved in the other groups. **Conclusion** Taruosan has a therapeutic effect on prophase atherosclerosis, which may be due to regulating the lipid metabolism, reducing the level of inflammatory factors, and conditioning the imbalance state of MMP-9/TIMP-1.

Key words: Taruosan; atherosclerosis; hypolipidemia; inflammatory factor; MMP-9; TIMP-1

动脉粥样硬化是一种发病机制复杂的心血管类疾病, 高脂血症、高血压、吸烟等因素均可诱导其

发生, 对其发病机制存在多种假说, 目前得到广泛认可的为损伤反应学说和由此发展的炎症理论, 此

收稿日期: 2013-03-29

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81102663)

作者简介: 张娜 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为少数民族药物心血管药理学研究。Tel: 18010198195 E-mail: 150319nana@sina.com

*通信作者 李志勇 Tel: (010)68533254-846

外血脂水平升高、炎症以及细胞因子间的相互作用在动脉粥样硬化的发生、发展过程中起重要作用。塔若散为彝族防治动脉粥样硬化的经验方,首载于彝族医药古书《聂苏诺期》,主要由松寄生和花椒树寄生组成,因寄生在彝语中称为“塔若”而得此方名。松寄生微咸、涩,归肝肾二路,具有息风止痉、化痰逐瘀、补益肝肾的功效。花椒树寄生味酸、平,归肝肾二路,具有平肝、息风止痉的功效。塔若散在民间主要用于治疗动脉粥样硬化类心血管疾病^[1]。本实验用塔若散干预早期动脉粥样硬化金黄地鼠,通过检测大鼠血脂水平、炎症因子和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)的变化,研究该方对高脂血症金黄地鼠早期动脉粥样硬化的影响及其可能的作用机制。

1 材料

1.1 药材与试剂

松寄生和花椒树寄生分别采自云南丽江和石林,经北京中医药大学中药学院杨瑶珺鉴定松寄生为桑寄生科松寄生 *Taxillus calcoreas* Diels Danser,花椒树寄生为芸香科植物花椒 *Zanthoxylum bungeanum* Maxun. 之寄生物。维生素 D₃ (批号 110905),上海通用药业股份有限公司;辛伐他汀片(批号 19990366),默沙东制药公司;血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒,北京中生北控科技有限公司;白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、MMP-9、TIMP-1 ELISA 试剂盒,上海博谷科技有限公司。

1.2 动物

雄性叙利亚金黄地鼠,SPF级,体质量(90 $\pm$ 5)g,北京维通利华生物科技有限公司提供,合格证号:SCXK(京)2012-0001。

1.3 仪器

Flexstation 3—715300 自动化筛选检测系统,美国分子仪器公司;日立 7020 自动生化检测仪;北京中医药大学自动照相生物显微镜及图像分析系统。

2 方法

2.1 塔若散水提液的制备

按照复方比例,准确称量松寄生和花椒树寄生的混合物 1 kg,置于 10 L 圆底烧瓶中,加入 5 倍体积的双蒸水,于电热套中 120 $^{\circ}$ C 回流提取 3 h,8 层纱布滤过,回收提取液,回流提取重复 3 次,合并提取液。共需制备 4 kg 药材。60 $^{\circ}$ C 水浴浓缩至

1.68 g/mL,备用。

2.2 早期动脉粥样硬化模型制备^[2-3]

叙利亚金黄地鼠适应性喂养 3 d 后随机分为对照组和造模组。对照组 10 只饲喂普通饲料,造模组 36 只饲喂高脂饲料(10%蛋黄粉、10%猪油、2%胆固醇、0.2%猪胆盐、10%蔗糖、67.8%基础饲料),同时造模金黄地鼠 1 次性 ip 维生素 D 3.6×10^6 U/kg,造模时间 9 周。造模结束后所有金黄地鼠进行血脂水平检测,随机抽取对照组 1 只和造模组 4 只金黄地鼠行 HE 染色,观察颈总动脉病理形态学变化,以血脂水平和颈总动脉病理变化情况对动物模型进行评价。

2.3 分组与给药

将造模金黄地鼠按血脂水平随机分为 4 组:模型组、辛伐他汀(4.2 mg/kg)阳性对照组、塔若散高和低剂量(生药 16.8、2.1 g/kg)组,于造模开始后第 10 周开始每天 ig 给药 1 次,连续给药 11 周。每周检测并记录 1 次体质量,以调整给药剂量。对照组与模型组分别 ig 等体积蒸馏水。造模过程中除对照组外均继续饲喂高脂饲料。

2.4 指标检测

2.4.1 血脂检测 第 20 周末,所有动物称体质量,ip 10%水合氯醛(3.5 mL/kg)麻醉,腹主动脉取血,制备血清。按照试剂盒说明书,酶法检测血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 的水平;ELISA 法检测血清中 IL-1 β 、TNF- α 、MMP-9、TIMP-1 的水平。

2.4.2 颈总动脉病理形态学观察 第 20 周末,所有动物取血后钝性分离金黄地鼠左侧颈总动脉至分叉处,截取颈总动脉约 4 mm,生理盐水冲洗,10%福尔马林溶液固定,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋、切片(4 μ m),行 HE 染色,生物显微镜($\times 400$)观察颈总动脉病理学的变化,应用病理检测实验室图像分析系统进行分析。

2.4.3 肝脏指数 第 20 周末,所有动物取血后摘取肝脏,称质量,计算肝脏指数^[4]。

$$\text{肝脏指数} = \text{肝脏质量(g)} / \text{体质量(g)} \times 100$$

2.5 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计学软件自动处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析。

3 结果

3.1 早期动脉粥样硬化模型的建立与评价

造模 9 周后,与对照组相比,模型组金黄地鼠

TC 水平升高 5.1 倍 ($P<0.01$), TG 水平升高 5.8 倍 ($P<0.01$), LDL-C 水平升高 12.1 倍 ($P<0.01$), 呈现典型的脂质代谢紊乱状态, 表明金黄地鼠高脂血症模型复制成功。结果见表 1。

造模 9 周后, 模型组金黄地鼠左侧颈总动脉病变部位呈现不同程度的内膜增厚、明显的钙化和破坏, 中膜的平滑肌细胞排列不规则 (图 1)。病理变化符合早期动脉粥样硬化模型标准。

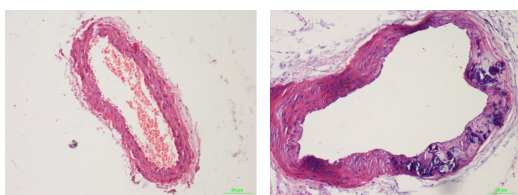
表 1 造模 9 周后金黄地鼠血脂水平分析 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Analysis of blood lipid levels in golden hamsters after nine weeks of modeling ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物 / 只	TC / (mmol·L ⁻¹)	TG / (mmol·L ⁻¹)	LDL-C / (mmol·L ⁻¹)	HDL-C / (mmol·L ⁻¹)
对照	10	2.62±2.05	2.50±0.82	0.74±0.13	1.95±0.07
模型	36	13.38±5.34**	14.53±6.77**	8.94±5.15**	2.35±2.60

与对照组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs control group



对照

模型

图 1 造模 9 周后金黄地鼠颈总动脉病理形态学观察

Fig. Pathomorphological analysis of carotid artery in golden hamster after nine weeks of modeling

3.2 对早期动脉粥样硬化金黄地鼠血脂水平和炎症因子的影响

3.2.1 对血脂水平的影响 与对照组相比, 模型组金黄地鼠血清中 TC、TG、LDL-C 的水平均显著升高 ($P<0.01$), HDL-C 水平变化不明显。与模型组比较, 塔若散各剂量组和辛伐他汀组金黄地鼠血清中 TC、TG、LDL-C 的水平显著降低 ($P<0.01$); 对 HDL-C 无显著影响。结果见表 2。

3.2.2 对炎症因子的影响 与对照组比较, 模型组金黄地鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 的水平均显著升高 ($P<0.05$ 、0.01)。与模型组比较, 除塔若散 2.1 g/kg

组金黄地鼠血清中 IL-1 β 升高外, 塔若散组和辛伐他汀组金黄地鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 水平均明显降低 ($P<0.05$ 、0.01)。结果见表 2。

3.3 对早期动脉粥样硬化金黄地鼠血清中 MMP-9 和 TIMP-1 水平的影响

与对照组比较, 模型组金黄地鼠 MMP-9 的水平显著升高 ($P<0.05$), TIMP-1 的水平也明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 塔若散组金黄地鼠血清中 MMP-9 水平显著降低 ($P<0.01$), TIMP-1 水平均显著升高 ($P<0.01$), 辛伐他汀组金黄地鼠血清中 MMP-9 水平显著降低 ($P<0.01$), TIMP-1 水平略有升高。结果见表 3。

3.4 对早期动脉粥样硬化金黄地鼠颈总动脉病理形态学的影响

对照组金黄地鼠颈总动脉内膜壁薄、光滑、完整, 细胞间连接紧密。模型组金黄地鼠颈总动脉内膜明显增厚, 有少量炎细胞堆积, 有明显蓝色钙化灶。塔若散各组、辛伐他汀组金黄地鼠颈总动脉损伤均得到明显改善, 内膜增厚与钙化现象不同程度地减弱。结果见图 2。

表 2 塔若散对早期动脉粥样硬化金黄地鼠血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Taruosan on blood lipid levels in golden hamsters with prophase atherosclerosis ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	TC / (mmol·L ⁻¹)	TG / (mmol·L ⁻¹)	LDL-C / (mmol·L ⁻¹)	HDL-C / (mmol·L ⁻¹)
对照	—	9	2.62±0.21	2.50±0.82	0.74±0.13	1.95±0.07
模型	—	8	16.87±4.49**	16.07±6.52**	11.32±3.06**	1.59±0.83
塔若散	16.8	8	8.63±2.37▲▲	5.84±3.59▲▲	5.21±2.47▲▲	2.98±0.69
	2.1	8	12.95±7.23▲▲	11.21±8.86▲▲	6.83±4.53▲▲	2.19±1.31
辛伐他汀	0.004 2	8	8.39±2.98▲▲	3.27±2.05▲▲	4.83±2.20▲▲	2.73±0.84

与对照组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: ▲▲ $P<0.01$, 表 4 同

** $P<0.01$ vs control group; ▲▲ $P<0.01$ vs model group, same as Table 4

表 3 塔若散对早期动脉粥样硬化模型金黄地鼠血清炎症因子和相关酶的影响 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effects of Taruosan on inflammatory factor and related enzymes of golden hamsters with prophase atherosclerosis ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	IL-1β / (pg·mL ⁻¹)	TNF-α / (pg·mL ⁻¹)	MMP-9 / (ng·mL ⁻¹)	TIMP-1 / (ng·mL ⁻¹)
对照	—	9	93.25 ± 46.78	10.70 ± 4.38	0.86 ± 0.32	1.74 ± 1.00
模型	—	8	259.18 ± 102.19*	45.12 ± 22.08**	1.35 ± 0.49*	2.57 ± 1.63**
塔若散	16.8	8	138.12 ± 44.69 [▲]	11.09 ± 5.74 ^{▲▲}	0.67 ± 0.47 ^{▲▲}	4.53 ± 1.45 ^{▲▲}
	2.1	8	357.08 ± 114.32	18.38 ± 8.08 ^{▲▲}	0.77 ± 0.18 ^{▲▲}	5.42 ± 1.12 ^{▲▲}
辛伐他汀	0.004 2	8	109.80 ± 36.95 [▲]	28.19 ± 12.78 ^{▲▲}	0.69 ± 0.30 ^{▲▲}	2.74 ± 0.78

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [▲] $P < 0.05$ ^{▲▲} $P < 0.01$ vs model group

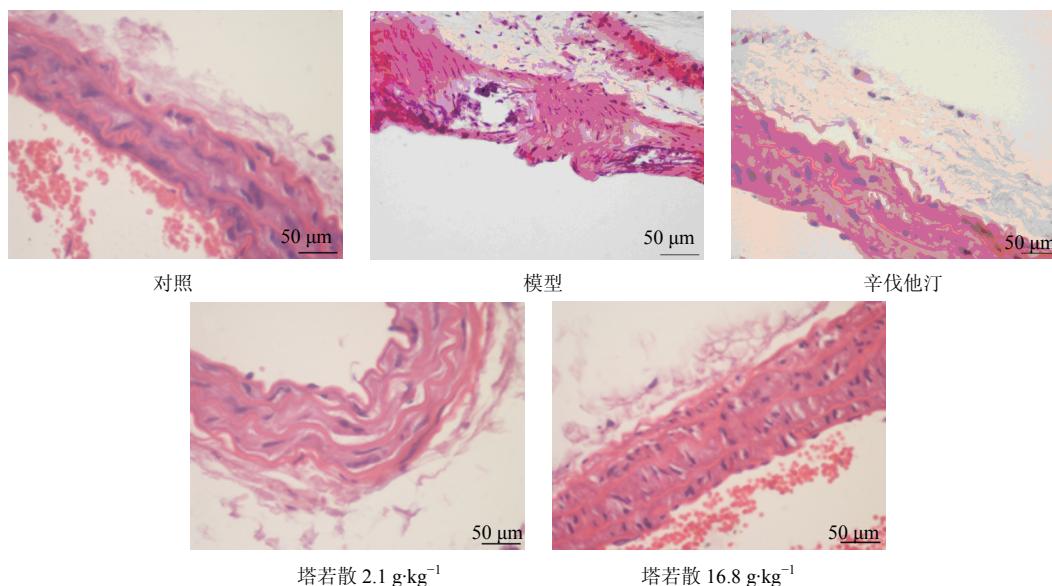


图 2 塔若散对早期动脉粥样硬化金黄地鼠颈总动脉病理形态学的影响

Fig. 2 Effect of Taruosan on pathomorphology of common carotid artery in golden hamsters with prophase atherosclerosis

3.5 对早期动脉粥样硬化金黄地鼠肝脏指数的影响

对照组金黄地鼠肝脏呈红色, 有弹性。模型组肝脏体积明显增大, 色泽黄腻, 呈典型脂肪肝形态。与对照组比较, 模型组金黄地鼠肝脏指数显著增大 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 塔若散各组和辛伐他汀组金黄地鼠肝脏指数显著减小 ($P < 0.01$)。结果见表 4。

4 讨论

血管内皮受损是动脉粥样硬化发生的关键因素, 受累动脉的病变首先从内膜开始, 血管壁钙超载作用是导致血管内膜损伤的重要原因。Fleckenstein 等^[5]发现, 健康动脉壁钙水平较低, 而在脂质条纹期、纤维斑块期, 尤其是复合斑块期, 动脉上会出现多处钙盐沉积。大剂量维生素 D₃ 可诱发机体发生动脉壁的钙化^[6]。本实验采用高脂饲料

表 4 塔若散对早期动脉粥样硬化模型金黄地鼠肝脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Taruosan on liver index of golden hamsters with prophase atherosclerosis ($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	动物 / 只	肝脏指数
对照	—	9	2.96 ± 0.20
模型	—	8	6.11 ± 0.64**
塔若散	16.8	8	5.19 ± 0.48 ^{▲▲}
	2.1	8	5.10 ± 0.57 ^{▲▲}
辛伐他汀	0.004 2	8	4.88 ± 0.38 ^{▲▲}

诱发金黄地鼠发生高脂血症, 在此基础上, 1 次性 ip 维生素 D₃ 引起高钙血症, 颈总动脉壁可见多处节段性硬化, 中膜和内膜明显增厚, 伴有多处钙化、

坏死, 内皮细胞完整度下降, 发生明显的动脉粥样硬化样变化。塔若散给药组对上述病变有明显的改善作用, 其机制可能与干预脂质代谢、炎症浸润以及调节 MMP-9/TIMP-1 的失衡有关。

动脉粥样硬化形成的重要原因之一是脂质代谢紊乱。大量研究表明, 高脂血症可引起肝脏病变以及血管内皮功能发生障碍, 导致单核细胞发生泡沫化, 促进动脉粥样硬化的发生。血液中 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平异常是动脉粥样硬化发生、发展的始动因素, 其中 LDL-C 通过氧化产生的 O_x -LDL 在诱发血管内皮损伤、加重动脉粥样硬化中至关重要。本实验显示, 塔若散显著降低 TC、TG、LDL-C 水平, 改善金黄地鼠脂肪肝样病变, 提示其可能通过调节 TC、TG、LDL-C 等脂质代谢紊乱达到治疗动脉粥样硬化的目的。HDL-C 的升高对于高脂血症及其并发症的防治具有重要的作用, 本实验发现, 经塔若散干预后, 动脉粥样硬化金黄地鼠血清中 HDL-C 水平呈小幅度升高, 提示其对 HDL-C 有一定的升高作用, 具体结果有待进一步研究。

Ross^[7]提出“动脉粥样硬化是一种炎症性疾病”的假说。多种细胞可以分泌大量前炎症因子, 如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等, 其中 IL-1 β 主要是由单核细胞、巨噬细胞以及内皮细胞产生, 可促进单核细胞黏附在内皮细胞, 导致血管内泡沫化细胞产生、平滑肌细胞增殖与迁移; TNF- α 主要来源于泡沫化巨噬细胞, 是动脉粥样硬化形成过程中发生内皮紊乱的主要病因之一^[8], 其通过激活血管平滑肌细胞合成 MMPs 的能力, 促进细胞外基质 (ECM) 的降解^[9]。本实验结果表明, 塔若散明显降低血清中 TNF- α 、IL-1 β 的水平, 提示调节某些炎症因子的释放可能是其治疗动脉粥样硬化的机制之一。

ECM 的合成或降解的失衡可能是动脉粥样硬化形成过程中一个十分重要的环节, 而 MMPs 与 TIMPs 是调节这个环节的最重要的酶类^[10]。当机体处于正常状态时, TIMP-1 分别与活化的 MMP-1、MMP-3 及活化或非活化的 MMP-9 以 1:1 的比例结合, 达到抑制动脉粥样硬化的目的, 其中与 MMP-9 的结合最为重要。当发生动脉粥样硬化时, 随着 MMP-9 分泌的增加, TIMP-1 的分泌量会相对受到抑制^[11-12], 导致 MMP-9/TIMP-1 的表达上调, 加速动脉粥样硬化进展。本实验结果表明, 塔若散

显著下调或抑制模型组金黄地鼠血清中 MMP-9 的水平, 上调或激活 TIMP-1, 达到缓解动脉粥样硬化发生的目的。

综上所述, 塔若散对于金黄地鼠动脉粥样硬化的发生与发展有一定的抑制作用, 其作用可能是通过调节血脂水平, 下调某些炎症因子, 如 TNF- α 、IL-1 β 等以及调节 MMP-9/TIMP-1 的失衡等机制实现的, 但具体作用机制有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 聂鲁, 赵永康, 马光发, 等. 聂苏诺期 [M]. 云南: 云南民族出版社, 1988.
- [2] 杨鹏远, 芮耀诚, 焦亚斌. 动脉粥样硬化大鼠实验模型的建立 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(7): 802-804.
- [3] 赵娟, 任立群. 大鼠动脉粥样硬化模型的复制 [J]. 实用医学杂志, 2008, 24(23): 4139-4141.
- [4] 田小芸, 恽时锋, 周森妹, 等. C57BL/KsJ-db、+/db 小鼠主要脏器重量及脏器系数的测定 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(4): 220-222.
- [5] Fleckenstein K N, Kehel L, Bouayadi F E, *et al.* New model of atherosclerosis in insulin resistant sand rats: hypercholesterolemia combined with D2 vitamin [J]. *Atherosclerosis*, 2000, 150(1): 55-61.
- [6] Takeo S, Anan M, Fujioka K, *et al.* Functional changes of aorta with massive accumulation of calcium [J]. *Atherosclerosis*, 1989, 77: 175-181.
- [7] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [8] Ridker P M, Rifai N, Pfeffer M, *et al.* Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2000, 101(18): 2149-2153.
- [9] 石胜伟. 冠脉斑块稳定性与炎症因子及 NF- κ B 的相关性研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2009.
- [10] 张永波. 黄芪三七有效成分配伍对动脉粥样硬化模型基质金属蛋白酶及其抑制物表达影响的实验研究 [D]. 山西: 山西医科大学, 2007.
- [11] Morishige K, Shimokawa H, Matsumoto Y, *et al.* Overexpression of matrix metalloproteinase-9 promotes intravascular thrombus formation in porcine coronary arteries *in vivo* [J]. *Cardiovasc Res*, 2003, 57(2): 572-585.
- [12] Amalinei C, Caruntu I D, Ciusca S E, *et al.* Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2010, 51(2): 215-228.