

宁心痛颗粒干预模型兔动脉粥样硬化易损斑块的生化指标观察*

潘仁智, 吴同启, 顾宁[△] (南京中医药大学第三附属医院, 江苏南京 210001)

【摘要】 目的 观察宁心痛颗粒对模型兔动脉粥样硬化易损斑块的稳定作用。方法 42 只新西兰大白兔随机分为 A、B1、B2、B3 和 B4 组, A 组 6 只, 给予普通饲料喂养, 2 周后采用球囊损伤, 外源性 p53 基因转染, B1、B2、B3 和 B4 组每组 9 只, 给予高脂饲料喂养, 2 周后采用球囊损伤腹主动脉, 第 10 周末于球囊损伤部位转染 p53 基因, 12 周末处死, 处死前 48、24 h 分别给予 2 次药物 (中国斑点蛙蛇毒和组胺) 触发建立兔动脉粥样硬化易损斑块模型。第 3 周起 B1、B2、B3 组分别给予宁心痛颗粒高剂量、常规剂量, 血脂康胶囊干预, B4 组作为模型组, 不予药物干预。各组分别于实验前和处死前取空腹血检测总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平, 计算 LDL-C/HDL-C、TG/HDL-C 及 TC/HDL-C 值。结果 高脂饲料喂养 12 周后, B1、B2、B3 和 B4 组实验兔 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平较 A 组明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B1 组 TC、TG、LDL-C 水平低于 B4 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B3 组 TC、LDL-C、HDL-C 水平低于 B4 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); B1 组、B2 组、B3 组 LDL-C/HDL-C、TG/HDL-C 及 TC/HDL-C 比值与 B4 组比较无明显差异 ($P > 0.05$); B1 组 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平与 B3 组相当, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); B1 组 TC 水平低于 B2 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 宁心痛颗粒对模型兔动脉粥样硬化易损斑块具有一定的稳定作用。

【关键词】 宁心痛颗粒; 动脉粥样硬化; 斑块; 总胆固醇

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.06.005 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)06-0649-03

Observation of biochemical markers of Ningxintong Granules in interfering atherosclerosis vulnerable plaques in rabbit model* PAN Ren-zhi, WU Tong-qi, GU Ning[△] (Third Affiliated Hospital, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of Ningxintong Ggranules (NXTG) on stabilizing the atherosclerosis vulnerable plaques in rabbit model. Methods 42 healthy new Zealand white rabbits were randomized into the group A, B1, B2, B3 and B4. The group A ($n=6$) was fed with standard chow, then underwent the balloon-induced damage 2 weeks later, and transfected by exogenous p53 gene. The group B1 ($n=9$), B2 ($n=9$), B3 ($n=9$) and B4 ($n=9$) were fed with the high cholesterol diet for 2 weeks, then underwent the balloon-induced abdominal aortic wall injury. At the end of 8 weeks, recombinant adenovirus carrying the p53 gene was injected through a catheter into the aortic segments rich in group B. After 2 weeks, all of the remaining rabbits in the group B underwent pharmacological triggering with injection of Chinese Russell's viper venom (CRVV) and histamine. At 3 weeks, the group B1 was treated with high dose of NXTG, the B2 group with normal dose of NXTG, the group B3 with Xuezhikang and the group B4 was as the baseline control group. At the beginning of the experiment and 12 weeks, blood samples were collected for measuring the lipid profile, which including TC, TG, LDL-C, HDL-C, LDL-C/HDL-C, TG/HDL-C and TC/HDL-C. Results After 12-week high lipid diet, compared with the group A, the serum lipid levels (TC, TG, LDL-C and HDL-C) in the group B1, B2, B3 and B4 were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the group B4, the levels of TC, TG and LDL-C in the group B1 were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with group B4, the levels of TC, LDL-C and HDL-C in the group B3 were decreased significantly ($P < 0.05$), there were no significant differences in TC, TG, LDL-C and HDL-C between group B1 and B3. Compared with the group B2, the TC level in the group B1 was decreased significantly ($P < 0.05$). Conclusion NXTG has effects leading to stabilize the vulnerable plaques in rabbit model.

【Key words】 Ningxintong Granules; atherosclerosis; vulnerable plaque; biochemical markers

冠心病 (CHD) 是严重危害人类健康的常见病和多发病, 其病理基础是动脉粥样硬化 (AS)。随着他汀类药物^[1] 以及药物洗脱支架的应用, CHD 的发病率和致死率明显下降。近年研究发现, 导致心血管事件的主要原因是 AS 斑块破裂和伴随的血栓形成, 后者取决于 AS 斑块的不稳定性, 即易损性 (vulnerability)。研究 AS 斑块不稳定的因素, 是预防心脑血管事

件的重要方法。现代医学认为, 稳定易损斑块的措施包括降低血脂、减少斑块的脂质含量、抗氧化、保护血管内皮细胞、抑制血管平滑肌异常增生、减轻炎症等方法。祖国医药学历史悠久, 积淀了较为丰富的方剂与药物, 具有多靶点、多层次、多方位、多作用途径, 以及价格低廉、不良反应小等特点。近年来关于中医药防治 AS 的研究很多, 宁心痛颗粒是南京中医药大学

* 基金项目: 江苏省中医药局科研基金资助项目 (HZ07003)。 △ 通讯作者, E-mail: guning@medmail.com.cn。

第三附属医院院内自制制剂。先期临床研究表明宁心痛颗粒联合常规西药治疗可明显缓解 CHD 不稳定性心绞痛(气虚血癖证)患者胸痹症状,改善中医证候,减轻心肌缺血,提高临床疗效。本研究在顾宁教授指导下通过动物实验进一步探讨宁心痛颗粒稳定易损斑块可能机制,以寻找中医治疗 AS,稳定易损斑块的有效手段。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 成年健康普通级新西兰大白兔 42 只,雄性 4 月龄,体质量 2.0~2.5 kg,由南京安立默科技有限公司提供,合格证号(SCXK 苏 2005-0003)。家兔饲养于温度 18~24 ℃、光照明暗各 12 h 清洁的饲养室内(南京中医药大学实验动物中心),分笼喂养,自由进食与饮水。

1.1.2 药 物 宁心痛颗粒剂:由黄芪、葛根、川芎、毛冬青、细辛组方,由南京中医药大学第三附属医院药剂科制备,每包 10 g(苏药制字 Z04000781,批号 081106)。血脂康:由北京北大维信生物科技有限公司生产,国药准字 Z10950029,批号 20091006。

1.1.3 动物模型建立所需主要材料与试剂 球囊导管与附件,普通饲料:南京青龙山动物繁殖场提供。分析胆固醇:购自南京铜人教学用品经营部。猪油:市售。蛋黄:市售。高脂饲料配置:胆固醇 0.5%、鲜鸡蛋黄 15%、熟猪油 5%均匀混合于普通饲料,由南京青龙山动物繁殖场配制。戊巴比妥钠,Ad5-p53 重组载体,中国斑点蝥蛇毒(CRVV),组胺。

1.1.4 生化指标检测所需仪器 日本 HITACHI 公司 7600-020 型全自动生化分析仪,配套试剂。

1.2 方 法

1.2.1 分组与模型建立 分组及给药方法 42 只雄性纯种新西兰大白兔适应性喂养 1 周,称质量,耳缘静脉采血,-86 ℃冻存待检。随机分成正常饮食组(A 组),球囊损伤+高胆固醇饲料(1%胆固醇+猪油 5%)喂养组(B 组)。A 组 6 只给予普通兔饲料喂养 12 周;B 组 36 只随机分为 B1、B2、B3、B4 组,每组 9 只,所有 B 组家兔高胆固醇饲料喂养 2 周后用球囊损伤腹

主动脉,于球囊损伤后 B1 组、B2 组分别给予宁心痛颗粒高剂量(宁心痛颗粒 2 g·kg⁻¹·d⁻¹)和低剂量(宁心痛颗粒 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃 10 周,B3 组给予血脂康(50 mg·kg⁻¹·d⁻¹)灌胃 10 周,B4 组作为模型组不给予药物干预,B 组家兔于 10 周末通过球囊导管在腹主动脉斑块形成处分别转染野生型 p53 基因,于第 12 周末给予中国斑点蝥蛇毒(CRVV)和组胺药物触发斑块破裂,心脏采血,-70 ℃冻存待检,然后过量戊巴比妥钠麻醉处死。

1.2.2 标本采集与检测 实验兔分别于实验前及 10 周末处死动物前作血液生化检查。禁食 12 h 以上,测量体质量后,经耳缘静脉抽取空腹血收集于血清分离管室温放置 30 min,然后 3 000×g 离心 5 min,取上清液-80 ℃保存待检。HITACHI 7600-20 全自动生化分析仪检测总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。

1.3 统计学方法 所有数据统计均用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,实验数据经正态性检验后以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间多样本均数的比较经方差齐性检验后采用单因素方差分析(ANOVA 检验)。如组间差异存有统计学意义,进行均数的两两比较,用 LSD 法。取 $\alpha=0.05, P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 使用新西兰大白兔,通过高脂喂养加球囊损伤,外源性 p53 基因转染,中国斑点蝥蛇毒(CRVV)和组胺触发,成功地建立了动脉粥样硬化易损斑块的动物模型。

2.2 高脂饲料喂养 12 周后,B1、B2、B3 和 B4 组实验兔 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平较 A 组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);B1 组 TC、TG、LDL-C 水平低于 B4 组,差异有统计学意义($P<0.05$);B3 组 TC、LDL-C、HDL-C 水平低于 B4 组,差异有统计学意义($P<0.05$);B1、B2、B3 组 LDL-C/HDL-C、TG/HDL-C 及 TC/HDL-C 比值与 B4 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);B1 组 TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平与 B3 组相当,差异无统计学意义($P>0.05$);B1 组 TC 水平低于 B2 组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组实验兔血脂指标及比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC(mmol/L)		TG(mmol/L)		LDL-C(mmol/L)		HDL-C(mmol/L)	
		实验前	处死前	实验前	处死前	实验前	处死前	实验前	处死前
A	6	1.66±0.19	1.73±0.52	0.76±0.23	0.81±0.24	0.57±0.17	0.60±0.13	0.64±0.15	0.77±0.20
B1	9	1.76±0.22	32.38±5.26 ^{abc}	0.70±0.36	1.60±0.45 ^b	0.62±0.11	26.42±4.97 ^{ab}	0.76±0.16	2.87±0.24 ^a
B2	9	0.83±0.37	39.79±4.05 ^a	0.69±0.25	2.28±1.20 ^a	0.58±0.19	32.21±3.97 ^a	0.77±0.25	3.20±0.38 ^a
B3	9	1.69±0.33	29.73±741 ^{abc}	0.72±0.28	1.81±0.63 ^a	0.61±0.20	24.68±6.74 ^{abc}	0.68±0.18	2.61±0.33 ^{abc}
B4	9	1.95±0.48	40.09±9.99 ^a	0.87±0.48	2.62±1.03 ^a	0.66±0.22	33.09±8.95 ^a	0.70±0.19	3.20±0.45 ^a

续表 1 各组实验兔血脂指标及比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LDL-C/HDL-C		TG/HDL-C		TC/HDL-C	
		实验前	处死前	实验前	处死前	实验前	处死前
A	6	0.97±0.47	0.80±0.16	1.24±0.41	1.12±0.43	2.71±0.64	2.29±0.45
B1	9	0.84±0.20	9.16±1.22 ^a	0.98±0.65	0.56±0.15 ^a	2.38±0.38	11.24±1.23 ^a
B2	9	0.82±0.38	10.07±0.91 ^a	0.94±0.36	0.73±0.40 ^a	2.48±0.58	12.46±0.94 ^a
B3	9	0.95±0.40	9.40±1.87 ^a	1.08±0.40	0.70±0.28 ^a	2.59±0.64	11.32±1.90 ^a
B4	9	0.98±0.29	10.22±2.06 ^a	1.30±0.69	0.82±0.29	2.86±0.57	12.41±2.17

注:与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B4 组比较,^b $P<0.05$;与 B2 组比较,^c $P<0.05$ 。

3 讨 论

越来越多的研究表明,粥样斑块的形成是一个漫长、复杂的过程,由多种因素参与,而炎症反应贯穿于不稳定斑块形成及破裂的全过程。随着炎症学说的兴起,近年来抗炎治疗对于稳定斑块的作用受到了重视。根据 AS 不稳定斑块的病理生理改变结合现代炎症学说,有学者提出“毒、瘀”是不稳定斑块的重要病机,并根据这一病机,认为解毒活血法是干预不稳定斑块的新治疗思路。由于许多解毒中药具有抗炎、杀菌、抑制病毒及免疫调节等作用,因此,从理论上推测这些解毒药可能作用于 AS 炎症反应的多个病理环节而达到稳定斑块的目的。近年来,中医药对于 AS 斑块稳定性的相关研究受到了重视,论文报道也逐渐增多。黑子清等^[2]观察了四逆汤对家兔 AS 的形成及血管壁神经酰胺含量的影响,发现四逆汤可明显缩小主动脉内膜脂质斑块面积,降低血清 TC、TG、LDL-C 水平。黄政德等^[3]研究了加味丹参饮(丹参、檀香、赤芍、川芎等)对家兔 AS 形成的影响,发现加味丹参饮能显著降低 AS 家兔血清 TC、TG、LDL、HDL 并能明显降低动脉硬化斑块面积与动脉总面积比值,减轻动脉病理变化。王强等^[4]观察了通脉胶囊(当归、川芎、丹参、黄芪、党参等组成)对 AS 内皮细胞损伤的保护作用,发现通脉胶囊可以通过抗氧化、抗血栓、调节血管功能达到对内皮细胞的保护从而抑制 AS 斑块的形成。张柏丽等^[5]对调肝导浊方药(柴胡、首乌、草决明、泽泻、大黄、茺蔚子、姜黄、丹皮)进行了相关的实验研究,发现调肝导浊方药在治疗 AS 中具有调节血脂,缩小动脉粥样硬化斑块面积的作用。尚改萍等^[6]观察了补阳还五汤抗 AS 的作用及其机制,证实与高脂血症家兔模型相比,补阳还五汤组血清 TC 和 TG 明显降低,主动脉、腹主动脉和冠状动脉粥样斑块面积显著减少。姜希娟等^[7]采用高脂饲料配合主动脉内皮球囊拉伤复制家兔 AS 易损斑块模型,观察到心脑血管宁(黄芪、当归、川芎、赤芍、水蛭等)能够有效降低血清 TC、TG、LDL-C 水平提高 HDL 水平。本研究发现高脂饲料喂养后,实验兔 TC、TG、LDL-C、HDL-C 及 LDL-C/HDL、TC/HDL-C 比值均明显升高。宁心痛颗粒高剂量可以降低实验兔血清 TC、TG、LDL 水平,作用优于宁心痛颗粒常规剂量;与血脂康胶囊相当。表明宁心痛颗粒高剂量在一定程度上能够降低血脂水平,稳定了易损斑块。

近年来,多项有关冠心病中医辨证的循证医学研究结果亦证明,气虚、血瘀是冠心病心绞痛最主要的两个证候要素^[8],气和血是构成和维持人体生命活动的基本物质。《灵枢·刺节真邪》说:“宗气不下,脉中之血,凝而留止。”不管何种原因引起气的功能不足,均可导致气的推动作用减弱从而导致血液运行不畅,继而脉络瘀滞,瘀血内生,形成虚中夹实的气虚血瘀证。现代医学认为 AS 是一个炎症过程,在炎症过程中白细胞、单核巨噬细胞等血液成分进入血管内皮,这可以理解为是气虚推动无力以及气虚不能固摄而造成 AS 的具现。顾教授认为 AS 易损斑块的病机特点为气虚为致病之本,瘀血等病理产生为标,瘀血著于血脉则形成斑块,若瘀滞日久不化可蕴热酿毒,导致斑块不稳定。虚与标实之间,本虚是关键。心气亏虚,瘀血凝滞为 AS 易损斑块的主要病机。宁心痛颗粒是顾教授经多年临床实践,在中医气血关系理论指导下、进行辨病辨证基础上,

遵循益气活血、化瘀通脉的治则而研制,是经江苏省食品药品监督管理局批准的院内中药自制制剂,由黄芪、川芎、葛根、毛冬青、细辛等组成。黄芪,味甘性微温,入脾、肺经。具有补气升阳、益卫固表、利水消肿、托疮生肌之功效。川芎,味辛性温,归肝、胆、心包经。葛根,“味甘性寒,气味俱薄,体轻上行,浮而微降,阳中阴也”,葛根提升中气,补而不滞,二药共为臣药。细辛,辛温有小毒,归肺、肾、心经,具有通窍止痛作用。毛冬青,为冬青科冬青属植物毛冬青的干燥根,味辛苦,性寒,归心、肺经,具活血通脉,清热解毒之功效;自 20 世纪以来被广泛用于治疗冠心病、脑血栓形成、血栓性脉管炎等疾病。宁心痛颗粒配伍严谨,标本兼顾,补益心气以固本,活血通脉以治标。共奏气血补通共行、标本兼顾之功。补气而不滞血,活血而不耗气。先期的临床研究已经证实宁心痛颗粒联合常规西药治疗,可明显缓解冠心病不稳定性心绞痛(气虚血瘀证)患者胸痛症状,改善中医证候,减轻心肌缺血,提高临床疗效。

综上所述,本项研究结果提示,宁心痛颗粒在一定程度上能够降低模型兔血脂水平,达到一定程度稳定 AS 易损斑块作用。但是,宁心痛颗粒是中药复方制剂,其有效部位或有效组分较多,本研究只初步揭示宁心痛颗粒稳定易损斑块的部分作用,其确切疗效机制有待今后进一步深入研究。

参考文献

- [1] Akdim F, van Leuven SI, Kastelein JJ, et al. Pleiotropic effects of statins: stabilization of the vulnerable atherosclerotic plaque[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(10): 1003-1012.
- [2] 黑子清, 吴伟康, 孙慧兰, 等. 四逆汤对兔实验性动脉粥样硬化斑块形成及血脂的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2003, 9(2): 27-29.
- [3] 黄政德, 张玉生, 葛金文, 等. 加味丹参饮对家兔动脉粥样硬化形成影响的研究[J]. *湖南中医学院学报*, 2002, 22(4): 4-6.
- [4] 王强, 黄国钧. 通脉胶囊抗动脉粥样硬化内皮细胞损伤的实验研究[J]. *中药药理与临床*, 2004, 20(1): 26-27.
- [5] 张柏丽, 陆一竹, 范英昌. 调肝导浊法中药抗高血脂及动脉粥样硬化的研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2002, 29(8): 509-510.
- [6] 尚改萍, 文志斌, 何晓凡, 等. 补阳还五汤抗家兔动脉粥样硬化形成及机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2002, 10(2): 112-114.
- [7] 姜希娟, 杜云, 苏金玲, 等. 心脑血管宁对家兔易损斑块模型血清 CRP 和斑块内炎细胞浸润的影响[J]. *天津中医药*, 2007, 24(5): 402-404.
- [8] 袁敬柏, 董绍英, 王阶, 等. 2689 例冠心病心绞痛证候要素的文献统计分析[J]. *中国中医药信息杂志*, 2006, 13(5): 100-101.