

本文引用:李迎秋,张国民,朱义刚,刘洋,肖海林,黎啸风,夏珊,周晋,赵爱明,何清湖.血府逐瘀汤对动脉粥样硬化家兔主动脉组织单核细胞趋化因子-1表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2017,37(12):1312-1315.

血府逐瘀汤对动脉粥样硬化家兔主动脉组织单核细胞趋化因子-1表达的影响

李迎秋,张国民*,朱义刚,刘洋,肖海林,黎啸风,夏珊,周晋,赵爱明,何清湖*
(湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

【摘要】目的 观察血府逐瘀汤对动脉粥样硬化家兔主动脉组织单核细胞趋化因子-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)表达的影响,并探讨血府逐瘀汤抗动脉粥样硬化的机制。**方法** 将24只清洁级日本雄性大耳家兔,随机分为3组,每组8只:空白组给予普通饲料;模型组先给予高胆固醇高脂饲料100 g/d后给予普通饲料;血府逐瘀汤组在模型组喂养的基础上,灌胃给予血府逐瘀汤,每天1次。喂养8周后,采血测定家兔血脂全套(TG、TC、LDL);应用光学显微镜观察兔主动脉切片的病理改变,测定其主动脉粥样硬化斑块灰度及斑块面积;利用免疫组织化学方法测定主动脉MCP-1蛋白的表达。**结果** 主动脉图像分析血府逐瘀汤组家兔胸主动脉斑块灰度及斑块面积分别低于模型组($P<0.01$);与空白组及血府逐瘀汤组相比,模型组家兔血清TC、TG、LDL均明显升高($P<0.05$)。血府逐瘀汤组家兔血清TC、LDL的水平却明显高于空白组($P<0.01$)。模型组家兔动脉粥样硬化家兔主动脉MCP-1蛋白表达平均灰度值明显高于血府逐瘀汤组和空白组($P<0.01$)。**结论** 血府逐瘀汤可以降低动脉粥样硬化家兔主动脉的MCP-1蛋白表达水平;血府逐瘀汤抗动脉粥样硬化的机制可能与其降低MCP-1蛋白表达水平有关。

【关键词】 血府逐瘀汤;单核细胞趋化因子-1;动脉粥样硬化;兔

【中图分类号】R285.5 **【文献标志码】**A **【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2017.12.004

Effects of Xuefu Zhuyu Decoction on the Expression of Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Aortic Tissue of Atherosclerosis Rabbits

LI Yingqiu, ZHANG Guomin*, ZHU Yigang, LIU Yang, XIAO Hailin, LI Xiaofeng, XIAN Shan, ZHOU Jin,
ZHAO Aiming, HE Qinghu*
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

【Abstract】Objective To observe the effect of Xuefu Zhuyu decoction on the expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in aortic tissue of atherosclerosis rabbits. **Methods** Twenty-four male rabbits were randomly divided into three groups, 8 rats in each group. The control group was fed with normal diet, the model group was given with 100g/d high fat and cholesterol diet before feeding normal diet; and Xuefu Zhuyu decoction group was administrated with Xuefu Zhuyu decoction, once daily. The concentrations of serum total cholesterol (TC), total triglyceride (TG), low density lipoprotein (LDL) were measured after eight weeks for feed. The pathology changes of the pathological section, degree and atherosclerotic plaque mean gray value and plaque area were observed by optical microscope. The expression of MCP-1 in atherosclerosis rabbits was detected by immunochemistry. **Results** The aortic atherosclerotic plaque mean gray value and plaque area of Xuefu

【收稿日期】2017-01-10

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(81373641);2012年度湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(2012181);2013年度湖南省中医药科研计划项目(2013161);2014年湖南省科学技术厅课题(2014SK3050)。

【作者简介】李迎秋,女,讲师,主要从事中西医结合男科和老年病研究。

【通讯作者】*何清湖,男,教授,博士研究生导师,E-mail:hqh1111@tom.com;张国民,男,教授,硕士研究生导师,E-mail:834095773@qq.com。

Zhuyu decoction group were lower than those of the model group ($P<0.01$). Compared with the blank group and Xuefu Zhuyu decoction group, the serum TC, TG and LDL of the model group increased obviously ($P<0.05$). The level of TC and LDL in Xuefu Zhuyu decoction was significantly higher than those in blank group ($P<0.01$). The average gray value of the expression of MCP-1 in the model group was significantly higher than those in the Xuefu Zhuyu decoction group and blank group ($P<0.01$).

Conclusion Xuefu Zhuyu decoction could decrease the expression of MCP-1 in aortic tissue of atherosclerosis rabbits. Its mechanism may be related with the lower MCP-1.

[**Keywords**] Xuefu Zhuyu decoction; monocyte chemoattractant protein-1; atherosclerosis; rabbits

随着经济增长人们生活方式的改变,我国动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)发病率逐年增高,是人类心脑血管疾病的首位病因^[1]。大量研究表明^[2-4]:血府逐瘀汤具有抗 AS 的功效,但具体机制尚不完全清楚。在动脉粥样硬化的发生发展过程中,单核细胞趋化因子-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)起重要作用^[5]。血府逐瘀汤是否通过影响 MCP-1 的表达从而发挥抗 AS 的功效,尚未见相关的报道。本研究通过观察血府逐瘀汤对动脉粥样硬化家兔主动脉组织 MCP-1 表达的影响,探讨血府逐瘀汤抗动脉粥样硬化的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

24 只清洁级雄性日本大耳家兔,体质量(2.0 ± 0.1) kg,由湖南中医药大学实验动物中心采购,长沙天勤生物技术有限公司提供,合格证号(SCXK(湘)2009-0012)。实验环境设施合格证号(SYXK(湘)2009-0001),分笼饲养,适应性喂养 1 周后开始实验。

1.2 药物及试剂

根据文献[2]制备实验用血府逐瘀汤,并去渣,浓缩至药液生药含量 1 000 g/L 灭菌后 4 ℃冷藏保存备用。胆固醇购自中国医药集团上海化学试剂公司(批号 14023)。

1.3 主要仪器

日立全自动生化分析仪(日立,7170S 型),Optimas 彩色数字图象分析仪(英国)。

1.4 动物分组

将 24 只清洁级日本雄性大耳家兔(SCXK(湘)2009-0012),随机分为 3 组,每组 8 只:空白组给予普通饲料;模型组每日每只动物喂饲高胆固醇高脂饲料 100 g,待其全部吃完后再喂饲普通饲料;血府

逐瘀汤组予以高胆固醇高脂饮食造模同时,根据体质量灌胃给血府逐瘀汤(含生药 7.10 g/kg·d),每天 1 次。所有家兔均每周测定体质量 1 次,并根据体质量的变化调整灌胃给血府逐瘀汤的剂量(血府逐瘀汤组)或蒸馏水(空白组和模型组),灌胃时间共 8 周。

1.5 血标本及组织标本的采取与处理

各组家兔喂养 8 周后,禁饮禁食 12 h,利用注射器从右心房缓慢抽血 10 mL,置于生化管中立即送湖南中医药大学检验科检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白(LDL)。随后处死家兔,距主动脉峡部 0.5 cm 处开始向远心端取 1 cm 长的胸主动脉,置入 10%福尔马林液中备用。

1.5.1 TC, TG, LDL 测定 所有血标本均采用盲法在湖南中医药大学附属一医院检验科全自动生化仪(日立,7170S 型)上测定 TC, TG, LDL。

1.5.2 家兔主动脉斑块面积及斑块灰度的测定 根据文献提供的方法^[2],主动脉标本,依次经过脱水,透明,石蜡包埋,冷冻,常规切片,苏木素-伊红(HE)染色,制成组织切片。采用光学显微镜察其病理改变,随后每个切片随机取 3 个视野,利用 Optimas 显微图像分析系统检测家兔主动脉斑块灰度以及斑块面积。

1.5.3 主动脉 MCP-1 蛋白表达的测定 上述主动脉组织切片完成后,严格按照试剂说明书和免疫组织化学方法操作。细胞膜、胞浆呈棕黄色颗粒黄染,提示 MCP-1 阳性,无黄染者提示为 MCP-1 阴性。每个主动脉标本随机选取 4 张切片,每张切片再随机选取 5 个高倍视野检测 MCP-1 蛋白表达的灰度值,取平均灰度值进行比较,平均灰度值越高,说明 MCP-1 阳性表达越强,反之则 MCP-1 阳性表达越弱。

1.6 统计学方法

所有的计量资料均采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,统计分析采

用 SPSS 19.0 统计软件包进行, 两组间的计量资料均数比较采用 q 检验, 多组间的均数的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和两两比较(LSD法)。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组家兔主动脉粥样硬化的病理形态学改变

肉眼观察: 空白组家兔主动脉内膜正常, 无明显病理改变; 模型组家兔主动脉内膜散在分布大量的向内隆起的淡黄色斑块, 形状不规则, 甚至沿管腔呈环状分布; 血府逐瘀汤组家兔主动脉内膜有少量淡黄色斑块形成, 隆起不明显, 淡黄色斑块呈间断分布, 很少连成片。光镜检查: 空白组主动脉内膜光滑平整, 内皮下未见脂质沉积; 模型组主动脉内有大量斑块形成, 斑块内有大量的泡沫细胞和增生的平滑肌细胞聚集; 血府逐瘀汤组主动脉可见少许斑块内, 斑块内间散在的泡沫细胞, 但无增生的平滑肌细胞(见图1)。主动脉图像分析血府逐瘀汤组家兔胸主动脉斑块灰度(157.29 ± 8.95)及斑块面积(2.13 ± 0.57) mm^2 分别低于模型组(187.56 ± 6.71) mm^2 和(4.93 ± 0.58) mm^2 , $P < 0.01$ 。见表1。

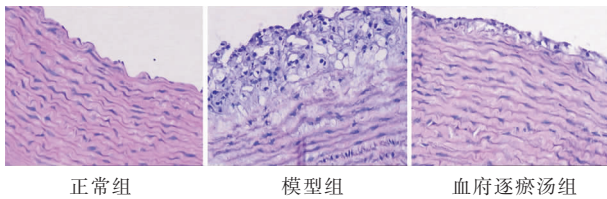


图1 各组家兔主动脉粥样硬化的病理形态学改变(HE, $\times 400$)

表1 血府逐瘀汤对家兔主动脉斑块灰度及斑块面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	斑块灰度	斑块面积/ mm^2	MCP-1
空白组	8	-	-	112.46 ± 6.16
模型组	8	187.56 ± 6.71	4.93 ± 0.58	165.38 ± 8.15
血府逐瘀汤组	8	$157.29 \pm 8.95^*$	$2.13 \pm 0.57^*$	131.67 ± 9.13

注:与模型组比较,* $P < 0.01$ 。

2.2 血府逐瘀汤对家兔血清 TC, TG, LDL 的影响

与空白组及血府逐瘀汤组相比, 模型组家兔血清 TC, TG, LDL 均明显升高 ($P < 0.05$)。与空白组相比, 血府逐瘀汤组家兔血清 TG 无显著性差异, 但是血府逐瘀汤组家兔血清 TC, LDL 的水平却明显高于空白组($P < 0.01$)。见表2。

表2 血府逐瘀汤对家兔血清 TC, TG, LDL 的影响

分组	$(\bar{x} \pm s, n=8, \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$		
	TC	TG	LDL
空白组	1.73 ± 0.41	1.09 ± 0.31	1.12 ± 0.27
模型组	$27.36 \pm 6.95^{##}$	$2.39 \pm 0.61^{##}$	$19.37 \pm 9.54^{##}$
血府逐瘀汤组	$16.43 \pm 5.73^{##*}$	$1.41 \pm 0.27^*$	$8.98 \pm 2.67^{##*}$

注:与空白组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与模型组比较, * $P < 0.01$ 。

2.3 血府逐瘀汤对动脉粥样硬化家兔主动脉 MCP-1 蛋白表达的影响

MCP-1 蛋白表达阳性表现呈棕黄色颗粒, 位于胞膜及胞浆内。各实验组 MCP-1 的阳性表达主要见于新生内膜, 中膜也有表达(见图2)。用病理图像分析系统测定空白组平均灰度值为(112.46 ± 6.16), 模型组平均灰度值为(165.38 ± 8.15), 血府逐瘀汤组平均灰度值为(131.67 ± 9.13)。空白组及血府逐瘀汤组平均灰度值明显低于模型组($P < 0.01$)。见表1。

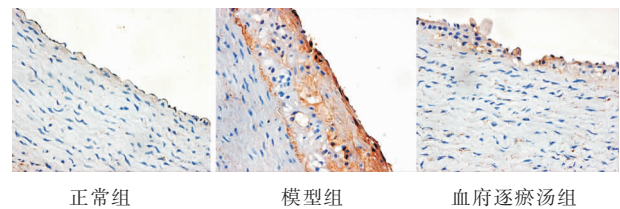


图2 各组家兔主动脉动脉 MCP-1 蛋白表达情况 (免疫组化, $\times 400$)

3 讨论

已经证实, MCP-1 在动脉粥样硬化斑块的形成和破裂中起着重要的作用^[6]。表达在血管内皮细胞表面的 MCP-1 与表达于单核细胞表面的主要受体是趋化因子受体 2(chemokine receptor, CCR-2) 结合后, 通过细胞膜上 G 蛋白耦联的磷酸肌醇等信号通路特异性趋化激活单核细胞, 并趋化其迁移入血管内皮下, 在巨噬细胞集落刺激因子的作用下分化为巨噬细胞, 大量摄取氧化型极低密度脂蛋白, 胆固醇在巨噬细胞内聚集, 最终使巨噬细胞转变为泡沫细胞^[7]。同时, MCP-1/CCR-2 可以上调粥样斑块里的内皮细胞 Bax 及下调 Bcl-2 表达, 诱导血管内皮细胞凋亡, 导致血管张力、脂质代谢及凝血机制的改变, 促进动脉粥样硬化斑块的形成^[8-9]。还有研究证实, MCP-1 可以诱导巨噬细胞表达基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase, MMP-9), 降解细胞外基

质胶原蛋白,导致动脉粥样斑块不稳定甚至破裂^[10]。临床上也有大量的研究证实,动脉粥样斑块内 MCP-1 的水平明显高于空白组组织,不稳定斑块内 MCP-1 的表达水平较稳定斑块增多,急性冠脉综合征患者血清的 MCP-1 水平高于稳定型心绞痛患者和健康人群^[11]。而且,MCP-1 水平对 ACS 患者的近期预后和远期预后均有独立的预测价值^[12]。总之,MCP-1 与动脉粥样硬化的发生发展密切相关,MCP-1 可能成为治疗动脉粥样硬化的一个新靶点^[13]。

在本研究中,与模型组相比,血府逐瘀汤组家兔主动脉粥样硬化病变程度较明显减轻。而且,血府逐瘀汤组家兔主动脉粥样硬化斑块灰度和斑块面积这两个动脉粥样硬化病变程度的客观指标也明显低于模型组,说明血府逐瘀汤具有抗动脉粥样硬化的作用,这与包括本课题组前期研究在内的国内外大量研究结果一致^[2-3]。但是,目前尚未发现相关血府逐瘀汤通过影响 MCP-1 发挥其抗动脉粥样硬化作用的研究报道。本文结果显示,与模型组相比,血府逐瘀汤组家兔主动脉 MCP-1 蛋白表达水平明显降低,说明血府逐瘀汤可能通过降低动脉粥样硬化家兔 MCP-1 蛋白表达水平,从而发挥抗动脉粥样硬化的作用。

血府逐瘀汤降低动脉粥样硬化家兔主动脉的 MCP-1 蛋白表达的确切机制,目前未见相关的研究。有研究证实,高脂血症损伤血管内皮细胞,激活血管壁的炎性反应,诱导血管内皮细胞 MCP-1 的表达^[4]。而在本研究中血府逐瘀汤组家兔血清 TC,LDL 明显低于模型组,故可以推测血府逐瘀汤可能是通过降低血清 TC,LDL 水平,减轻高脂血症对血管内皮细胞的损伤,从而降低主动脉血管内皮细胞 MCP-1 的表达,确切的机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] 李 靓,谢 巍.我国动脉粥样硬化基础研究近三年进展[J].中国动脉硬化杂志,2015,23(11):1182-1188.

- [2] 李迎秋,赵爱明,曾 辉,等.血府逐瘀汤对动脉粥样硬化家兔血清非对称性二甲基精氨酸水平的影响[J].中国中药杂志,2009,34(12):1530-1534.
- [3] 陈 慧,张文将,唐 标,等.血府逐瘀汤对动脉血栓模型大鼠抗凝系统的影响[J].湖南中医药大学学报,2016,36(3):29-32.
- [4] 耿兆辉,寿宝栋,刘 辉.血府逐瘀汤对动脉粥样硬化大鼠血脂及血管活性物质的影响[J].河北大学学报:自然科学版,2011,31(3):304-308.
- [5] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999,340(2):115-126.
- [6] Geronimo FR, Barter PJ, Rye KA, et al. Plaque stabilizing effects of apolipoprotein A-IV[J]. Atherosclerosis, 2016,251:39-46.
- [7] Namiki M, Kawashima S, Yamashita T, et al. Local over-expression of monocyte chemoattractant protein-1 at vessel wall induces infiltration of macrophages and formation of atherosclerotic lesion: synergism with hypercholesterolemia [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002,22(1):115-120.
- [8] Lin J, Kakkar V, Lu X. Impact of MCP-1 in atherosclerosis[J]. Curr Pharm Des, 2014,20(28):4580-4588.
- [9] Zhang X, Liu X, Shang H, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 induces endothelial cell apoptosis in vitro through a p53-dependent mitochondrial pathway [J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2011, 43(10):787-795.
- [10] Tan C, Liu Y, Li W, et al. Associations of matrix metalloproteinase-9 and monocyte chemoattractant protein-1 concentrations with carotid atherosclerosis, based on measurements of plaque and intima-media thickness[J]. Atherosclerosis, 2014,232(1):199-203.
- [11] Amasyali B, Kose S, Kursaklioglu H, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 in acute coronary syndromes: complex vicious interaction[J]. Int J Cardiol, 2009,136(3):356-357.
- [12] De Lemos JA, Morrow DA, Blazing MA, et al. Serial measurement of monocyte chemoattractant protein-1 after acute coronary syndromes: results from the A to Z trial[J]. J Am Coll Cardiol, 2007,50(22):2117-2124.
- [13] Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011,31(7):1506-1516.
- [14] Wiesner P, Tafelmeier M, Chittka D, et al. MCP-1 binds to oxidized LDL and is carried by lipoprotein(a) in human plasma [J]. J Lipid Res, 2013,54(7):1877-1883.

(本文编辑 李 杰)