

丹黄通脉方对颈动脉粥样硬化性狭窄模型大鼠 炎症反应及脑血流量的影响

李嘉民 刘海涛 马建刚 杨春燕

(河北省石家庄市第一人民医院, 石家庄, 050011)

摘要 目的:探究丹黄通脉方对颈动脉粥样硬化性狭窄模型大鼠炎症反应及脑血流量的影响。方法:将 SPF 级、雄性 SD 大鼠 80 只随机分为正常组、阳性对照组、模型组和观察组, 每组 20 只。阳性对照组、模型组及观察组大鼠均采用高脂加高蛋白复合饲料喂养联合颈总动脉球囊拉伤术法构建颈动脉粥样硬化性狭窄大鼠模型, 正常组给予普通饲料喂养, 且不进行颈总动脉球囊拉伤术。造模成功后, 阳性对照组大鼠给予辛伐他汀 2.5 mg/kg 灌胃给药, 观察组大鼠给予丹黄通脉方 20 g/kg (浓度:10 mL/kg) 灌胃给药, 正常组与模型组则灌胃等量生理盐水, 2 次/d, 各组均连续给药 8 周。干预结束后, 采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清中血脂四项总胆固醇(TC), 三酰甘油(TG), 低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) 及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C) 水平; 采用酶联免疫吸附试验法(ELISA) 检测各组大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、C 反应蛋白(CRP) 及同型半胱氨酸(Hcy) 水平; HE 染色观察大鼠颈动脉病理学形态变化; 采用激光多普勒血流仪测定各组大鼠脑血流量。结果:与正常组比较, 模型组和观察组 TC、TG、LDL-C 水平, TNF- α 、IL-6、CRP 及 Hcy 水平显著升高, 而 HDL-C 显著降低; 但与模型组比较, 阳性对照组和观察组 TC、TG、LDL-C 水平, 炎症反应递质 TNF- α 、IL-6、CRP 及 Hcy 水平显著降低, 而 HDL-C 显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与正常组比较, 模型组和观察组大鼠局部脑血流量显著降低; 与模型组比较, 阳性对照组和观察组大鼠脑血流量明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:丹黄通脉方可有效降低颈动脉粥样硬化性狭窄大鼠的血脂, 具有抗炎作用, 可降低炎症递质水平, 可增加脑血流量。

关键词 丹黄通脉方; 颈动脉粥样硬化性狭窄; 炎症反应; 脑血流量

Effects of Danhuang Tongmai Recipe on Inflammatory Reaction and Cerebral Blood Flow in Rats with Carotid Atherosclerotic Stenosis

LI Jiamin, Liu Haitao, Ma Jiangan, Yang Chunyan

(Shijiazhuang First People's Hospital, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Danhuang Tongmai Recipe on inflammatory response and cerebral blood flow in rats with carotid atherosclerotic stenosis. **Methods:** A total of 80 SPF and male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal group ($n = 20$), a positive control group ($n = 20$), a model group ($n = 20$) and an experimental group ($n = 20$). Rats in the positive control group, the model group and the experimental group were treated with high-fat plus methionine compound feed combined with carotid artery balloon injury to construct a rat model of carotid atherosclerotic stenosis. The normal group was fed with normal feed and no ballooning of the common carotid artery was performed. After successful modeling, rats in the positive control group were given simvastatin 2.5 mg/kg by intragastric administration, and rats in the experimental group were administered with Danhuang Tongmai Recipe 20 g/kg (concentration:10 mL/kg). The normal group and the model group were given the same amount of normal saline twice a day, and each group was continuously administered 8 weeks. After the intervention, the levels of TC, TG, LDL-C and HDL-C in the serum of the rats in each group were detected by automatic biochemical analyzer; The levels of TNF- α , IL-6, CRP and Hcy in the serum of each group were detected by ELISA; HE staining was used to observe the pathological changes of carotid artery in rats; The cerebral blood flow of each group was measured by laser Doppler flowmetry. **Results:** Compared with the normal group, the levels of TC, TG, LDL-C, TNF- α , IL-6, CRP and Hcy in the model group and experimental group significantly increased, while HDL-C significantly reduced; Compared with the model group, TC, TG, LDL-C levels, inflammatory factors TNF- α , IL-6, CRP and Hcy levels significantly reduced in the positive control group and the experimental group, while HDL-C significantly increased ($P < 0.05$); At the same time, compared with the normal group, the cerebral blood flow significantly reduced in the model group and the experimental group; Compared with the model group, the cerebral blood flow of the positive control group and the experimental group significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Danhuang Tongmai Recipe can effectively reduce the blood lipids of rats with carotid atherosclerotic stenosis, with anti-inflammatory effects,

which can reduce the level of inflammatory mediators. At the same time, it can also increase cerebral blood flow, which is worthy of clinical recommendation.

Key Words Danhuang Tongmai prescription; Carotid atherosclerotic stenosis; Inflammatory reaction; Cerebral blood flow

中图分类号:R289.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.11.020

近年来,颈动脉粥样硬化性狭窄的发病率逐年升高,是缺血性血管疾病的重要致病因素。已有研究证实,颈动脉粥样硬化是一种炎性反应性疾病,血脂异常是动脉粥样硬化的独立危险因素,血脂代谢紊乱可激活炎性反应,促进疾病的发生、发展^[1-2]。研究发现,颈动脉粥样硬化性狭窄可引起不同程度的脑血流动力学障碍,是脑中风的独立危险因素^[3]。丹黄通脉方由丹参、黄连、葛根和三七组成,具有调节血脂、稳斑通脉、抗炎等功效。为此,本研究旨在探究丹黄通脉方对颈动脉粥样硬化性狭窄模型大鼠炎性反应及脑血流量的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 SPF 级、雄性、健康 SD 大鼠 80 只,6~8 周龄,体质量 250~300 g,购于第四军医大学实验动物中心,动物生产许可证号为 SCXK(军)2007-007 号。

1.1.2 药物 丹参、黄连、葛根和三七粉饮片(陕西中医学院第二附属医院);高脂加高蛋白氨基酸饲料(北京科澳协力饲料有限公司);辛伐他汀(成都华宇制药有限公司,批号:090702)。丹黄通脉方由丹参、黄连、葛根和三七粉组成(质量比为 2:1:1:0.2),取适量水煎煮 2 次,浓缩至浓度为 2 g/mL,密封。

1.1.3 试剂与仪器 总胆固醇(TC),三酰甘油(TG),低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(德国罗氏诊断有限公司);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、C 反应蛋白(CRP)及同型半胱氨酸(Hcy)酶联免疫吸附试验检测试剂盒(北京普尔伟业生物科技有限公司)等。

LEICARM2235 石蜡切片机(德国 Leica 公司);5417R 型台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);PF5001 激光多普勒血流仪(瑞典 PERIMED 公司);BH2 生物显微镜(苏州鸥斯特光学仪器有限公司)等。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将 SPF 级、雄性 SD 大鼠 80 只随机分为正常组、阳性对照组、模型组及观察组。正常组大鼠给予普通饲料喂养,其余各组大鼠

给予高脂加高蛋白氨基酸复合饲料喂养,4 周末采血检测血清 TC 和 Hcy 值,确定升高后行颈总动脉球囊拉伤术:4%水合氯醛腹腔麻醉大鼠,结扎右颈外动脉远心端,阻断右颈总动脉近心端及右颈内动脉血流,于右颈外动脉远心端放入 2.0F 动脉去栓导管,充入 0.1~0.2 mL 气体,然后匀速回拉球囊,并回抽球囊内气体,取出导管,恢复血流^[4]。将建模成功的 60 只颈动脉粥样硬化性狭窄大鼠随机分为阳性对照组、模型组及观察组,每组 20 只。

1.2.2 给药方法 阳性对照组大鼠给予辛伐他汀 2.5 mg/kg 灌胃给药,观察组大鼠给予丹黄通脉方 20 g/kg(浓度为:10 mL/kg)灌胃给药,正常组与模型组则灌胃等量生理盐水,2 次/d,各组均连续给药 8 周。

1.2.3 检测指标与方法 全自动生化分析仪检测各组大鼠血清中血脂水平:末次药物干预后,各组大鼠断尾取血,血液标本离心,3 000 r/min,15 min,取上清液。采用全自动生化分析仪检测大鼠血脂水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。

酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测大鼠血清中 TNF- α 、IL-6、CRP 及 Hcy 的水平:将采集好的各组大鼠的血液标本离心,3 000 r/min,15 min,取上清液。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中 TNF- α 、IL-6、CRP 及 Hcy 的水平,操作严格按照试剂盒说明书进行。

苏木精-伊红(HE)染色观察颈动脉病理学形态:末次药物干预后,处死各组大鼠,收集颈动脉标本。4%多聚甲醛固定,经脱水、包埋、切片等步骤后进行 HE 染色,于光镜下观察颈动脉内膜增生、炎性细胞浸润、管壁增厚及管腔狭窄等病理变化。

脑血流量测定:末次药物干预后,采用 4%水合氯醛腹腔麻醉大鼠,固定大鼠头部,在额顶约 1 cm 处暴露颅骨,牙科钻在左侧颅骨钻开一个颅窗(约 4 mm×4 mm),剥离使露出软脑膜。采用激光多普勒血流仪监测脑血流值,以灌注单位(PU)表示,记录 3 次,取平均值。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血脂 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 水平比较 与正常组比较,模型组、观察组大鼠血脂 TC、TG、LDL-C 水平显著升高,而 HDL-C 显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);但与模型组比较,阳性对照组和观察组 TC、TG、LDL-C 水平显著降低,而 HDL-C 显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6、CRP 及 Hcy 水平比较 与正常组比较,阳性对照组、模型组和观察组大鼠肺组织中 TNF- α 、IL-6、CRP 及 Hcy 水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);但与模型组比较,阳性对照组和观察组炎症反应因子 TNF- α 、IL-6、CRP 及 Hcy 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 各组大鼠颈动脉病理学改变情况比较 正常组大鼠颈动脉内膜光滑,未观察到内膜增生,内皮细胞完整,平滑肌细胞形态规则,且未见脂质沉积。模型组颈动脉内膜增厚,结构不清晰,有大量炎性细胞浸润,伴胆固醇结晶及钙化病灶。阳性对照组和观

察组大鼠颈动脉内膜轻度增厚,内膜欠光滑,伴少量纤维增生及炎性细胞浸润。见图 1。

2.4 各组大鼠脑血流量比较 正常组、模型组、阳性对照组及观察组大鼠脑血流量值分别为(392.31 ± 79.25) PU、(218.57 ± 75.24) PU、(364.82 ± 71.36) PU 和(321.93 ± 68.83) PU。与正常组比较,模型组和观察组大鼠局部脑血流量显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,阳性对照组和观察组大鼠脑血流量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

动脉粥样硬化通常表现为脂质沉积,伴平滑肌细胞增殖,引起管壁增厚、管腔狭窄,进而导致内皮功能障碍和血管炎性反应^[5]。同时,动脉粥样硬化往往发生在颈动脉分叉处,造成颈动脉斑块和狭窄。研究发现,颈动脉粥样硬化性狭窄与缺血性脑血管病密切相关^[6]。近年来,中医药治疗颈动脉粥样硬化性狭窄疾病备受关注,也取得了较大进展。

中医学理论认为,颈动脉粥样硬化性狭窄属于热毒血瘀证,该病位在血脉,瘀血停聚,气血运行受

表 1 各组大鼠血脂 TC、LDL-C、HDL-C 及 TG 水平比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
正常组($n=20$)	2.26 ± 0.15	2.12 ± 0.63	0.68 ± 0.14	0.98 ± 0.17
模型组($n=20$)	$4.34 \pm 0.61^*$	$5.53 \pm 0.51^*$	$3.12 \pm 1.31^*$	$0.45 \pm 0.11^*$
阳性对照组($n=20$)	$2.42 \pm 0.17^\Delta$	$2.73 \pm 0.16^{*\Delta}$	$1.29 \pm 0.15^{*\Delta}$	$0.83 \pm 0.16^\Delta$
观察组($n=20$)	$3.12 \pm 0.36^{*\Delta}$	$3.65 \pm 0.18^{*\Delta}$	$1.78 \pm 0.21^{*\Delta}$	$0.71 \pm 0.15^{*\Delta}$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $^\Delta P < 0.05$

表 2 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-6、CRP 及 Hcy 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	CRP (mg/L)	Hcy (μ mol/L)
正常组($n=20$)	78.73 ± 9.29	51.57 ± 6.72	0.24 ± 0.02	2.57 ± 0.41
模型组($n=20$)	$192.57 \pm 15.41^*$	$112.96 \pm 5.78^*$	$0.43 \pm 0.06^*$	$13.11 \pm 1.43^*$
阳性对照组($n=20$)	$96.45 \pm 10.87^{*\Delta}$	$59.73 \pm 9.07^{*\Delta}$	$0.31 \pm 0.02^{*\Delta}$	$4.24 \pm 1.71^{*\Delta}$
观察组($n=20$)	$115.89 \pm 11.84^{*\Delta}$	$71.05 \pm 9.12^{*\Delta}$	$0.32 \pm 0.03^{*\Delta}$	$6.35 \pm 1.83^{*\Delta}$

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $^\Delta P < 0.05$

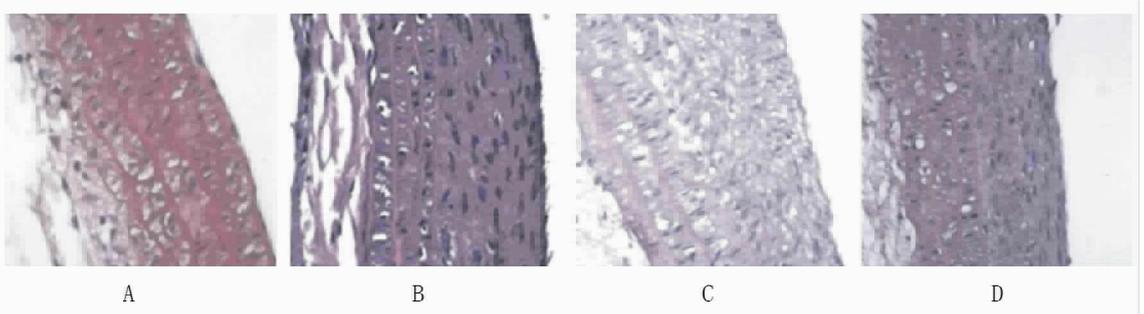


图 1 光学显微镜下观察大鼠颈动脉染色结果(HE 染色, $\times 200$)

注:A:正常组;B:模型组;C:阳性对照组;D:观察组

阻,日久成“毒”,损伤脉络,进而阻痹脉管。丹黄通脉方由丹参、黄连、葛根、三七组成,丹参活血化瘀,黄连清热解毒,两药配伍祛瘀血,解瘀毒,佐以葛根通利血脉,三七活血消斑,全方具有活血解毒、消斑通脉的功效。血脂代谢紊乱可造成血管内皮功能受损,促进炎症反应递质释放,进而加速颈动脉粥样硬化狭窄的发展^[7]。研究发现,急性脑血管病患者血清中 TNF- α 与 IL-6 水平显著增加^[8]。也有研究发现,颈动脉粥样硬化患者血清 TNF- α 与 IL-6 水平明显升高,且随着疾病加重而呈上升趋势,提示 TNF- α 与 IL-6 参与颈动脉粥样硬化的形成与发展^[9]。CRP 是一个独立的动脉硬化预测指标。研究表明,CRP 可能直接参与了颈动脉粥样硬化的形成,且与颈动脉粥样硬化有明显相关性^[10]。

Hcy 可能是动脉粥样硬化等心血管疾病的一个独立危险因素引起关注,研究发现,Hcy 能加剧局部炎症反应,进而促进颈动脉粥样硬化发展,并与卒中密切相关^[11]。已有研究证实,颈动脉粥样硬化患者血清中 Hcy 表达显著增加,且 Hcy 表达水平与颈动脉粥样硬化程度正相关^[12],并推测 Hcy 与颈动脉粥样硬化性狭窄和斑块的形成密切相关。研究发现,黄连和三七可有效降低血管炎性反应和氧化应激反应,也可通过抗炎和调节血脂等作用,抑制动脉粥样硬化发展^[13]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组和观察组 TC、TG、LDL-C 水平, TNF- α 、IL-6、CRP 及 Hcy 水平显著升高,而 HDL-C 显著降低;但与模型组比较,阳性对照组和观察组 TC、TG、LDL-C 水平,炎症反应递质 TNF- α 、IL-6、CRP 及 Hcy 水平显著降低,而 HDL-C 显著升高,提示丹黄通脉方可有效降低颈动脉粥样硬化性狭窄大鼠的血脂,也可降低炎症反应递质水平,具有抗炎作用。

脑血流量的测定是评价脑缺血损伤与修复的重要指标,同时,颈动脉粥样硬化性狭窄可引起不同程度的脑血流障碍。研究发现,丹参具有增加微循环灌流量,改善脑部微循环、减轻颈动脉粥样硬化狭窄的作用;黄连提取物也可扩张软脑膜微循环,改善微循环障碍,维持大脑血流量;葛根可使脑内耗氧降低,对脑缺血、缺氧具有保护作用^[14];研究发现,三七总皂苷可明显扩张小鼠软脑膜微血管,增加局部血流量,保护脑组织^[15]。有研究表明,丹黄通脉方可增加颈动脉粥样硬化模型大鼠的脑血流量,具有预防因脑缺血、缺氧导致脑组织损伤的作用^[16]。本研究结果显示,与正常组比较,模型组和观察组大鼠局部脑血流量显著降低;与模型组比较,阳性对照组

和观察组大鼠脑血流量明显升高,提示丹黄通脉方可增加脑血流量,降低脑血流障碍,保护大鼠脑组织。

综上所述,丹黄通脉方可有效降低颈动脉粥样硬化性狭窄大鼠的血脂,具有抗炎作用,可降低炎症反应递质水平,同时,还可增加脑血流量。

参考文献

- [1] Arao K, Yasu T, Umamoto T, et al. Effects of pitavastatin on fasting and postprandial endothelial function and blood rheology in patients with stable coronary artery disease [J]. *Circ J*, 2009, 73 (8): 1523-1530.
- [2] Davis NE. Atherosclerosis-an inflammatory process [J]. *J Insur Med*, 2005, 37 (1): 72-75.
- [3] Ishikawa S, Ito H, Yokoyama K, et al. Phenylephrine ameliorates cerebral cytotoxic edema and reduces cerebral infarction volume in a rat model of complete unilateral carotid artery occlusion with severe hypotension [J]. *Anesth Analg*, 2009, 108 (5): 1631-1637.
- [4] 王建辉,李磊,柳芳,等.大鼠颈总动脉粥样硬化易损斑块模型建立与评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17 (17): 158-162.
- [5] Ishii T, Asuwa N, Masuda S, et al. The effects of a myocardial bridge on coronary atherosclerosis and ischaemia [J]. *J Pathol*, 1998, 185 (1): 4-9.
- [6] 徐大雄,徐世成,罗华.瑞舒伐他汀联合普罗布考对颈动脉粥样硬化斑块患者血脂及 CRP 的影响 [J]. *贵州医科大学学报*, 2016, 41 (7): 848-850, 854.
- [7] 韩丽蓓,吴兢,朱爱华.原发性血脂异常患者情志证素分布规律及与血脂指标相关性研究 [J]. *北京中医药大学学报: 中医临床版*, 2013, 36 (6): 20-22.
- [8] 刘恒方,高灵利,王建平,等.脂联素、肿瘤坏死因子- α 、白介素-6 与人颈动脉粥样硬化斑块关系的研究 [J]. *中华神经医学杂志*, 2014, 13 (2): 151-155.
- [9] Shimoda M, Kaneto H, Yoshioka H, et al. Influence of atherosclerosis-related risk factors on serum high-sensitivity C-reactive protein levels in patients with type 2 diabetes: Comparison of their influence in obese and non-obese patients [J]. *J Diabetes Investig*, 2016, 7 (2): 197-205.
- [10] 齐秀彦,杨晓茹.急性脑梗死患者同型半胱氨酸水平与动脉粥样硬化的相关性研究 [J]. *世界中医药*, 2015, 2 (a01): 592-593.
- [11] 翟莉红.缺血性卒中患者血清同型半胱氨酸水平与动脉粥样硬化的相关性 [J]. *山东医药*, 2015, 16 (42): 94-95.
- [12] 王美玲.彩色多普勒超声对脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块的诊断价值 [J]. *中国药物经济学*, 2017, 12 (2): 144-146.
- [13] 廖瑞雪,刘彦慧,王媛媛,等.丹参酮 II A 对新生大鼠缺血缺氧性脑损伤脑组织 IL-1 β 和 TNF- α 水平的影响 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2014, 31 (11): 1002-1004.
- [14] 任超,王萍,闫东明,等.三七总皂苷对动脉粥样硬化小鼠的治疗作用 [J]. *中国药理学通报*, 2018, 34 (9): 1289-1295.
- [15] 王永刚,齐婧,郑刚,等.丹黄通脉方对颈动脉粥样硬化性狭窄模型大鼠脑血流量的影响 [J]. *中医药导报*, 2012, 18 (10): 16-18.