



大鼠动脉粥样硬化痰瘀互结病证结合模型的建立及方药干预研究

陈洁¹, 缪静², 周鑫斌², 蔡宏文¹, 毛威¹

(1. 浙江中医药大学附属第一医院心内科, 杭州 310006; 2. 浙江中医药大学第一临床医学院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 建立大鼠动脉粥样硬化痰瘀互结病证结合模型,并观察模型大鼠炎症因子的变化以及方药(丹蒌片)的干预作用。**方法** 32只雄性SD大鼠随机分为正常组、模型组、阿托伐他汀钙组(ATV组)、丹蒌组(DLP组),每组8只。正常组大鼠喂食基础饲料,余3组均采用高脂饮食+维生素D3腹腔注射联合颈动脉球囊损伤的方法复制痰瘀互结型AS模型。模型组、ATV组、DLP组分别给予生理盐水、阿托伐他汀钙混悬液、丹蒌片混悬液灌胃干预4周。干预结束后,HE染色观察大鼠胸主动脉病理学改变,检测大鼠血清中血脂、hs-CRP、IL-6、TNF- α 和LP-PLA2水平,RT-PCR法检测大鼠胸主动脉组织内IL-6、TNF- α 和LP-PLA2 mRNA表达。**结果** ①与正常组比较,模型组大鼠血清中TC、LDL-C、hs-CRP、IL-6、TNF- α 和LP-PLA2水平升高($P < 0.05$),HDL-C下降($P < 0.05$),血管组织中IL-6、TNF- α 和LP-PLA2表达升高($P < 0.05$),HE染色光镜下观察,模型组大鼠胸主动脉内皮细胞排列不完整,内膜明显不规则增厚,内皮下间隙增宽,泡沫细胞聚集,脂质沉着,形成了典型的AS斑块。②与模型组比较,ATV组与DLP组大鼠血清TC、LDL-C和hs-CRP、IL-6、TNF- α 和LP-PLA2水平降低($P < 0.05$),胸主动脉组织内IL-6、TNF- α 和LP-PLA2的表达下降($P < 0.05$),ATV组与DLP组两组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。HE染色光镜下观察,ATV组与DLP组大鼠胸主动脉内膜增生明显减轻,斑块面积减小,动脉粥样硬化的程度减轻。**结论** 采用高脂饮食+维生素D3腹腔注射联合颈动脉球囊损伤的方法可以建立AS痰瘀互结证的大鼠模型,并且痰瘀同治方药(丹蒌片)可以改善该模型大鼠的AS和炎症反应。

【关键词】 动脉粥样硬化;痰瘀互结证;病证结合;炎症反应;丹蒌片

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 09-0022-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.009.005

Establishment of a rat model of atherosclerosis with syndrome of intermingled phlegm and blood stasis and intervention experiment with a Chinese medicine prescription Danlou tablet

CHEN Jie¹, MIAO Jing², ZHOU Xin-bin², CAI Hong-wen, MAO Wei¹

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China;
2. the First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)

【Abstract】 Objective To establish a rat model of atherosclerosis combined with syndrome of intermingled phlegm and blood stasis, to observe the inflammatory reactions and the treatment effect of prescription (Danlou tablet) on the rat model. **Methods** Thirty-two healthy male SD rats were randomly and equally divided into four groups, namely, normal

【基金项目】 浙江省教育厅科研项目(Y201327471);吴阶平基金项目(320.6750.12397)。

【作者简介】 陈洁(1978-),女,主治医师,硕士,研究方向:中西医结合心血管病方向,E-mail: ktrina_cj@163.com。

【通讯作者】 毛威(1965-),男,主任医师,教授,博导,研究方向:中西医结合心血管病方向,E-mail: maoweilw@163.com。

control group, model control group, atorvastatin group (ATV group), and Danlou group (DLP group). The normal control group was given basic forage, while other three groups were given high fat forage plus intraperitoneal injection of vitamin D3 and balloon injury of the left common carotid artery to build rat atherosclerosis model combined with syndrome of intermingled phlegm and blood stasis, and then received intragastric administration of saline, atorvastatin suspension and Danlou tablets suspension for 4 weeks, respectively. After intervention, both serum lipid and hs-CRP, IL-6, TNF- α , and LP-PLA2 levels were determined by ELISA, pathological alterations in the thoracic aorta was analyzed using HE staining, the expressions of IL-6, TNF- α and LP-PLA2 mRNA in the thoracic aorta tissue were assessed by real-time fluorescent quantitative PCR technology. **Results** ① Compared with the normal control group, there were significant increases in serum TC, LDL-C, hs-CRP, IL-6, TNF- α , and LP-PLA2 levels ($P < 0.05$ for all) and decrease of serum HDL-C levels in the model group ($P < 0.05$). The expressions of IL-6, TNF- α , and LP-PLA2 mRNA in the rat aorta were significantly increased ($P < 0.05$ for all). In the model control group, HE staining showed altered arrangement of aortic endothelial cells, irregular intimal thickening, broadened subendothelial space, and accumulation of foam cells and lipid deposition, forming typical atherosclerotic plaques. ② Compared with the model control group, the ATV and DLP groups showed significantly decreased serum TC, LDL-C, hs-CRP, IL-6, TNF- α , and LP-PLA2 levels ($P < 0.05$ for all) as well as the expressions of IL-6, TNF- α , and LP-PLA2 mRNA in the thoracic aorta ($P < 0.05$ for all). There were no significant differences between the ATV and DLP groups ($P > 0.05$). There were also reduced aortic intimal hyperplasia, macrophage infiltration and plaque area compared with those of the model group. **Conclusions** Rat model of atherosclerosis combined with syndrome of intermingled phlegm and blood stasis can be established by high fat diet feeding combined with the intraperitoneal injection of vitamin D3 and balloon injury of carotid artery. The prescription (Danlou tablet) can inhibit the inflammatory reaction and ameliorate atherosclerotic changes in the rat models.

【Key words】 Atherosclerosis; Syndrome of intermingled phlegm and blood stasis; Combination of disease and syndrome; Inflammatory reaction; Danlou tablet; Rat

近年来,我国缺血性心脑血管病的发病率一直呈上升趋势^[1],发病年龄年轻化,是严重危害人类健康的“头号杀手”。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是导致冠心病、心肌梗死、脑梗塞等缺血性心脑血管疾病的罪魁祸首,尽管现代医学有许多防治 AS 的药物,如阿司匹林、他汀等,但仍不能完全阻止 AS 的进程,大量研究证实^[2-4]中医药在抗 AS 方面也显示了其独特的优势。近代,对于 AS 的防治多从“瘀血”论治,主张“活血化瘀”,但随着研究的深入,人们发现由于生活方式和饮食结构的改变,高脂血症患者增多,AS 瘀瘀互结型比例日渐增加^[5],且贯穿于 AS 的始终。曹洪欣等^[6]通过对 209 例冠心病患者的证候分析发现,瘀瘀互结型占 57.4%,是 AS 的常见证型。因此,AS 的治疗已由单纯的“活血化瘀”转为“瘀瘀同治”,“化痰、祛瘀、瘀瘀同治”的治则在防治 AS 方面日益重要。建立动脉粥样硬化瘀瘀互结病证结合模型,有助于为瘀瘀同治方药抗 AS 的机理研究提供实验依据。本实验采用病证结合的方法复制 AS 瘀瘀互结证模型大鼠,观察血脂、炎症因子等客观指标及形态学变化,同时观察瘀瘀同治方药(丹菱片)对上述模型大鼠客观指标的调节作用,探讨 AS 瘀瘀互结证的实质,并初步探讨瘀瘀

同治方药防治 AS 的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 32 只,6~8 周龄,体重(220~250)g,由中国科学院上海实验动物中心/上海斯莱克实验动物有限责任公司提供[SCXK(沪)2012-0002]。饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障系统大鼠饲养室[SYXK(浙)2013-0184];实验期间按实验动物使用的“3R”原则给以人道主义关怀。

1.2 试验药物

丹菱片(DLP)由吉林康乃尔药业有限公司提供;阿托伐他汀钙(ATV,立普妥)规格:20 mg $\times$ 7 片,批号:国药准字 H20051408,由辉瑞制药有限公司提供。

1.3 试剂

维生素 D3 注射液(VD3)购至上海通用药业股份有限公司;血清生化指标检测试剂:总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C),均购至上海申能德赛诊断技术有限公司;检测试剂盒:大鼠超敏 C 反应蛋白

(high sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)、白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、脂蛋白相关磷脂酶 A2 (lipoprotein-associated phospholipase A2, LP-PLA2) 等 ELISA 检测试剂盒, 购至杭州诚维生物科技有限公司; 逆转录试剂盒 (One Step PrimeScript miRNA cDNA synthesis kit)、荧光定量试剂盒 (SYBR C^{Q} Premix Ex TaqTM II)、RNA Extraction kit (总 RNA 提取试剂盒), 购至日本 TaKaRa 公司。

1.4 实验仪器

7020 型全自动生化分析仪, 日本日立公司; Thermo 多功能酶标仪, 美国 Thermo 公司; PTC-200 型 PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司; iQ5 型 RT-PCR 仪, 美国 Bio-Rad 公司;

1.5 方法

1.5.1 动物模型建立: 雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 高脂饲喂 (胆固醇 1%、猪油 10%、蛋黄粉 10%、3 号胆盐 0.5%、基础饲料 78.5%), 同时一次性腹腔注射 40 万 IU/kg 的 VD₃。VD₃ 注射 2 周后, 参照文献^[7,8]行主动脉球囊损伤术。大鼠用 3% 戊巴比妥钠 (45 mg/kg) 腹腔麻醉, 颈部剃毛, 背部固定于鼠板。碘酒消毒颈部皮肤, 无菌条件下作颈部正中开口, 钝性分离大鼠左侧颈总动脉, 结扎远心端, 动脉夹夹闭近心端, 暂时阻断左侧颈总动脉近心及远心端血流。在两端之间的动脉壁上约呈 45° 显微剪剪开一“V”形开口, 向近心端仔细轻柔插入 (2.0×20) mm 直径球囊导管, 松开动脉夹, 使球囊进入近心端动脉, 并向颈总动脉起始部推送 8~10 cm。手推式压力泵注入生理盐水, 将球囊充盈, 用 4~6 ATM 加压球囊, 然后, 回抽球囊, 当球囊回撤至切口处时球囊完全减压, 然后再将球囊导管推送入主动脉, 再次充盈球囊、回抽减压, 使之与动脉内膜摩擦, 造成内膜机械损伤。如此来回摩擦 5 次后, 释放球囊气体, 退出导管, 结扎近心端颈总动脉。生理盐水冲洗伤口, 并洒青霉素钠防感染, 缝合肌肉和皮肤, 碘酒再次消毒皮肤, 将动物放入保温箱保暖护理待其苏醒。

1.5.2 实验分组给药: 次日, 选择手术成功的大鼠 24 只, 按体重随机分为 3 组, 即模型组 (model)、阿托伐他汀钙组 (ATV)、丹莪片组 (DLP), 每组 8 只, 另 8 只作为正常组 (normal)。临用前在无菌条件下, 分别将 ATV、丹莪片粉末用生理盐水溶解至 1 mg/mL、100 mg/mL, ATV 组每天灌胃 ATV 5 mg/kg;

丹莪片组每天灌胃 500 mg/kg; 正常组和模型组大鼠均 5 mg/kg 生理盐水灌胃, 连续 4 周。试验期间, 除正常组饲喂普通饲料外, 其余各组高脂饲喂, 并于给药前和给药 2 周时分别注射 10 万 IU/kg VD₃。

1.5.3 一般情况的观察: 每天观察并记录大鼠的活动度、对外界反应的灵敏度、精神状况、皮毛光泽、舌苔舌质、二便等情况。

1.5.4 病理形态学观察: 给药 4 周后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 取血完毕后, 立即游离整段胸主动脉, 横向切取胸主动脉并分为 2 段, 上段放入液氮冷冻罐中冻存, 备组织 RNA 提取使用; 下段标本立即置入 4% 甲醛固定液固定 1 天, 然后脱水透明, 浸蜡包埋, 切片 (厚度为 5 μ m), 贴片, 最后 HE 染色封片。倒置相差显微镜下观察血管壁及内膜的病理结构。

1.5.5 血清生化指标以及 hs-CRP、IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 检测: 用全自动生化仪测定大鼠血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C 等指标。采用 ELISA 法分别测定血清中 hs-CRP、IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 含量。操作步骤按照试剂盒说明进行。

1.5.6 胸主动脉 IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 mRNA 测定: 用 RNA extraction kit (总 RNA 提取试剂盒) 提取大鼠胸主动脉组织总 RNA, 并用 PrimeScriptTM RT reagent kit (逆转录试剂盒) 合成 cDNA, 操作步骤按 TaKaRa 公司产品操作说明书进行。将 cDNA 用实时荧光定量 PCR 仪进行扩增, PCR 扩增条件为: 95℃ 变性 5 min; (95℃ × 10 s, 60℃ × 30 s, 72℃ × 30 s) × 40 个循环后; 72℃ 延伸 7 min。以 GAPDH 为内参基因, 用 Primer 5.0 软件设计引物, IL-6 mRNA 序列的引物为: 正义链: 5'-ATTGTATGAACAGCGATGATGCAC-3', 反义链: 5'-CCAGGTAGAAACGGAAGTCCAGA-3', 扩增长度 150 bp; TNF- α mRNA 序列的引物为: 正义链: 5'-TGCCTCAGCCTCTTCTCATT-3', 反义链: 5'-GCTTGCTGGTTTGCTACGAC-3', 扩增长度 209 bp; Lp-PLA2 mRNA 序列的引物为: 正义链: 5'-AAT TCC TCA GCC CCT CTT TTT TAT-3', 反义链: 5'-AGT AGC ATT TTT TCA TTC TGA GGA TGT-3', 扩增长度 527 bp; GAPDH mRNA 序列的引物为: 正义链: 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3', 反义链: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3', 扩增长度 143 bp。所有信息由 Bio-Rad iQ5 PCR 仪收集, 根据 Ct 值, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各个基因的相对表达量。

1.6 统计学方法

所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 19.0 软件进行正态分布检验和方差齐性检验后, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, 以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 一般情况的观察

模型组大鼠造模 2 周后开始出现精神萎靡, 倦伏少动, 反应迟钝, 毛色发黄、无光泽、大便稀溏, 舌苔白, 舌质暗红。

2.2 病理形态学观察

HE 染色结果显示, 正常组大鼠胸主动脉内膜光滑平整, 血管组织结构正常, 未见明显病理改变; 模型组大鼠内皮细胞排列不完整, 内膜明显不规则增厚, 内皮下间隙增宽, 泡沫细胞聚集, 脂质沉着, 形成了典型的 AS 斑块; ATV 组与 DLP 组大鼠胸主动脉内膜增生明显减轻, 斑块面积减小, 动脉粥样硬化的程度减轻。(图 1, 见文后彩插 1)

2.3 血液生化结果

模型组大鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平升高, HDL-C 下降, 与正常组相比, 除甘油三酯以外, 其余

指标差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。ATV 组与 DLP 组血清 TC、LDL-C 水平较模型组均降低 ($P < 0.05$), ATV 组与 DLP 组两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。DLP 组对血清 HDL-C 水平有升高趋势, 虽然与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但与 ATV 组相比, 优于 ATV 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.4 血清 hs-CRP、IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 水平

模型组大鼠血清 hsCRP、IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 水平明显高于正常组 ($P < 0.05$), ATV 组与 DLP 组均能降低 AS 模型大鼠血清中 hs-CRP、IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 水平 ($P < 0.05$), ATV 组与 DLP 组两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 2)。

2.5 胸主动脉 IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 mRNA 水平

模型组大鼠胸主动脉组织中 IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 mRNA 水平均高于正常组 ($P < 0.05$), ATV 组与 DLP 组均能降低 AS 模型大鼠胸主动脉 IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 的表达 ($P < 0.05$), ATV 组与 DLP 组两组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (表 3)。

表 1 大鼠血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平 (mmol/L, $n = 8$)
Tab. 1 The serum TC, TG, HDL-C, and LDL-C levels of the rats (mmol/L, $n = 8$)

组别 Groups	总胆固醇 TC	甘油三酯 TG	高密度脂蛋白 HDL-C	低密度脂蛋白 LDL-C
正常组 Normal	1.568 $\pm$ 0.089	0.405 $\pm$ 0.181	0.828 $\pm$ 0.025	0.290 $\pm$ 0.041
模型组 Model	3.796 $\pm$ 1.631 *	0.563 $\pm$ 0.238	0.587 $\pm$ 0.071 *	2.271 $\pm$ 1.336 *
阿托伐他汀钙组 ATV	2.315 $\pm$ 0.656 Δ	0.427 $\pm$ 0.174	0.540 $\pm$ 0.069	1.177 $\pm$ 0.549 Δ
丹蔘片组 DLP	2.450 $\pm$ 0.563 Δ	0.511 $\pm$ 0.099	0.639 $\pm$ 0.077 #	1.177 $\pm$ 0.464 Δ

注: 与正常组相比, * $P < 0.05$, 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$, 与 ATV 组相比, # $p < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, * $P < 0.05$; compared with the model group, $\Delta P < 0.05$; compared with the ATV group, # $P < 0.05$.

表 2 大鼠血清 hs-CRP、IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 水平 ($n = 8$)
Tab. 2 The serum hs-CRP, IL-6, TNF- α , and LP-PLA2 levels of rats ($n = 8$)

组别 Groups	超敏 C 反应蛋白 hs-CRP (ng/mL)	白介素-6 IL-6 (pg/mL)	肿瘤坏死因子- α TNF- α (pg/mL)	脂蛋白相关磷脂酶 A2 LP-PLA2 (ng/mL)
正常组 Normal	62.83 $\pm$ 7.78	63.31 $\pm$ 7.14	182.23 $\pm$ 24.77	117.36 $\pm$ 12.23
模型组 Model	127.27 $\pm$ 14.31 *	156.40 $\pm$ 21.45 *	339.56 $\pm$ 29.79 *	229.42 $\pm$ 27.42 *
阿托伐他汀钙组 ATV	102.50 $\pm$ 9.48 Δ	116.91 $\pm$ 13.62 Δ	289.55 $\pm$ 20.18 Δ	185.59 $\pm$ 14.09 Δ
丹蔘片组 DLP	103.04 $\pm$ 9.36 Δ	113.19 $\pm$ 9.15 Δ	277.29 $\pm$ 30.35 Δ	178.27 $\pm$ 13.91 Δ

注: 与正常组相比, * $P < 0.05$, 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, * $P < 0.05$; compared with the model group, $\Delta P < 0.05$.

表 3 大鼠胸主动脉 IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 mRNA 水平 ($n=8$)Tab. 3 The expression levels of IL-6, TNF- α , and LP-PLA2 mRNA in the rat thoracic aorta ($n=8$)

组别 Groups	白介素-6 IL-6	肿瘤坏死因子- α TNF- α	脂蛋白相关磷脂酶 A2 LP-PLA2
正常组 Normal	1.057 $\pm$ 0.697	1.074 $\pm$ 0.343	1.032 $\pm$ 0.174
模型组 Model	12.197 $\pm$ 9.302 *	10.032 $\pm$ 6.054 *	1.324 $\pm$ 0.251 *
阿托伐他汀钙组 ATV	1.130 $\pm$ 0.363 Δ	2.772 $\pm$ 2.593 Δ	0.919 $\pm$ 0.209 Δ
丹蔘片组 DLP	2.209 $\pm$ 0.776 Δ	1.702 $\pm$ 0.859 Δ	0.820 $\pm$ 0.197 Δ

注:与正常组相比, * $P < 0.05$, 与模型组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note. Compared with the normal group, * $P < 0.05$; compared with the model group, $\Delta P < 0.05$.

3 讨论

病证结合动物模型是在制备动物模型时,将西医的病、中医的证同时考虑制备出的动物模型,体现了西医“病”与中医“证”的紧密联系。病证结合动物模型的建立为中医方药的疗效和机制研究提供实验依据,在中医药研究和新药研发中起重要作用。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的中医证型按发病比例依次为痰瘀互结型、肝肾阴虚型、气虚血瘀型、脾虚湿盛型^[9],其中痰瘀互结型发生率最高。中医研究认为^[10,11]:该证型是由于过食肥甘厚腻而致脾虚,脾胃虚衰可致津液代谢失常,聚而为痰,痰浊引起血液粘稠性增高,流动性降低,从而产生瘀血。随着人们生活水平的提高,嗜食油腻,嗜好烟酒,必然导致这一型的增加。痰瘀互结证的 AS 患者多表现为体胖多痰、肢体麻木疼痛、苔白腻、脉沉滑或涩、舌暗紫。我们实验采用高脂饲喂大鼠,致其痰浊血瘀,同时注射 VD3 促进血管钙化和球囊损伤血管内皮,大鼠表现出体胖,精神萎靡,反应迟钝,舌苔白,舌质暗红等痰瘀互结证表现,动脉血管壁出现内膜增生,粥样斑块形成等动脉粥样硬化表现。这说明通过高脂饮食 + VD3 腹腔注射联合颈动脉球囊损伤可以建立大鼠 AS 痰瘀互结证的病证结合模型。

AS 的形成是一个漫长而复杂的过程,现代医学公认炎症与 AS 密切相关。无论是斑块的形成过程中还是斑块糜烂、破裂的不稳定状态中,炎症都占有相当重要的地位。多种炎性细胞因子、粘附分子等参与了 AS 的炎症反应,如 hs-CRP、白介素家族(IL-1、IL-2、IL-6、IL-8)、TNF- α 、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)和血管细胞间粘附分子-1(VCAM-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)以及最近发现的炎性标记物 LP-PLA2^[12]等。hs-CRP 是炎症发生时最主要的敏感性指标之一;IL-6、TNF- α 是一种促炎症细胞因子,介导和放大了许多相互作用,导致炎症发展、

斑块不稳定和促血栓形成;而 Lp-PLA2 主要作用是水解氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)上的氧化磷脂,生成溶血卵磷脂(Lyso-PC)和氧化游离脂肪酸(ox-FFA),后二者为促炎介质,能刺激炎性细胞因子和粘附分子的产生,促进粥样硬化斑块形成及使粥样斑块不稳定化^[13,14]。AS 的中医证候与血脂、炎症因子也有一定的相关性^[15,16]。任毅等^[16]研究发现:冠心病痰浊血瘀证患者血脂和 hs-CRP 明显高于非痰浊血瘀者。洪永墩等^[17]通过分析 524 例冠心病患者中医证候与炎症因子的关系发现,痰热血瘀是冠心病最常见的中医证候,该证患者血中 CRP、IL-6、TNF- α 含量均较其他组显著升高,CRP、IL-6、TNF- α 等炎症指标可作为冠心病辨证的参考指标。我们对模型大鼠血液中血脂和炎症因子检测发现,模型处理组大鼠血液中除甘油三酯外,TC、LDL-C、hs-CRP、IL-6、TNF- α 、LP-PLA2 含量明显升高,HDL-C 水平下降,与正常组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。基因检测同时发现,模型组大鼠胸主动脉组织中 IL-6、TNF- α 和 LP-PLA2 的基因表达也明显升高。说明了 AS 痰瘀互结证大鼠同时伴有 TC、LDL-C 以及 hs-CRP、IL-6、TNF- α 、LP-PLA2 等炎症因子的升高和 HDL-C 的下降。

丹蔘片是痰瘀同治方的代表药,主要由瓜蒌皮、薤白、葛根、川芎、丹参、赤芍、泽泻、黄芪等成分合成,具有宽胸通阳,化痰散结,活血化瘀的作用。临床研究^[18,19]证实丹蔘片能很好的缓解痰瘀互结型冠心病心绞痛患者的临床症状。我们用丹蔘片干预 AS 痰瘀互结证大鼠模型,干预后,大鼠血液中 TC、LDL-C、hs-CRP、IL-6、TNF- α 、LP-PLA2 水平明显下降,同时胸主动脉组织中的 IL-6、TNF- α 、LP-PLA2 基因表达量也减少,动脉粥样硬化程度减轻,而且与阿托伐他汀钙相比,疗效相似,差异无统计学意义($P > 0.05$)。丹蔘片组在升高 HDL-C 方面还优于阿托伐他汀钙组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。痰瘀同治方药(丹蔘片)具有改善痰瘀互结型动脉

粥样硬化的作用,可能与其降低 TC、LDL-C,升高 HDL-C,抑制 hs-CRP、IL-6、TNF- α 、LP-PLA2 等炎症因子表达有关。在中医理论的指导下,运用现代动物实验方法,模拟病因、模拟症状、模拟客观指标、以药物反证是建立中医动物模型的四项基本要求。通过痰瘀同治方药(丹菱片)的药物反证也证实了该模型复制成功。

综上所述,通过高脂饮食 + VD3 腹腔注射联合颈动脉球囊损伤建立的 AS 痰瘀互结证大鼠模型基本与人类的疾病特征相似,具有周期短,稳定性、重复性好的优点。痰瘀同治方药(丹菱片)可以改善该模型大鼠的动脉粥样硬化,可能与其抑制炎症反应的作用有关。

参考文献:

- [1] 陈伟伟,高润霖,刘力生,等. 中国心血管病报告 2013 概要 [J]. 中国循环杂志, 2014, 29(7): 487-491.
- [2] 樊继山,刘丹宁,何翠瑶,等. 炎症诱导的新型大鼠动脉粥样硬化模型的建立及 Rb1 的防治作用 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 60-65.
- [3] 吴同启,顾宁. 中药干预动脉粥样硬化易损斑块的研究进展 [J]. 中国中医急症, 2011, 20(2): 284-286.
- [4] 文川,徐浩,黄启福,等. 几种活血中药对 ApoE 缺陷小鼠动脉粥样硬化斑块的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(5): 864-867.
- [5] 袁东超,李艳娟,张哲,等. 基于 logistic 分析的心脑合并痰瘀互结证诊断探索 [J]. 中国卫生统计, 2014, 31(2): 312-314.
- [6] 曹洪欣,张华敏. 痰瘀互结与冠心病发病机理辨识 [J]. 中医药学刊, 2001, 19(6): 545.
- [7] Tulis DA. Histological and morphometric analyses for rat carotid balloon injury model [J]. Methods Mol Med, 2007, 139: 31-66.
- [8] 陆红玲,汤阳,黄跃,等. 颈动脉球囊损伤对高同型半胱氨酸诱导兔动脉粥样硬化病变的形成无明显影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4): 43-46.
- [9] 张艳,于睿,刘文华,等. 心脑血管粥样硬化中医证型与易患因素分析研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3): 699-700.
- [10] 徐丹,杨关林. 从痰瘀方面浅谈冠心病病因病机 [J]. 中外健康文摘, 2009, 6(25): 256-257.
- [11] 支艳,马建伟,魏汉林,等. 试论中医痰瘀相关理论 [J]. 中医临床研究, 2011, 3(2): 58-60.
- [12] Vittos O, Toana B, Vittos A, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2): a review of its role and significance as a cardiovascular biomarker [J]. Biomarkers. 2012, 17(4): 289-302.
- [13] Rosenson RS, Stafforini DM. Modulation of oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis by lipoprotein-associated phospholipase A2 [J]. J Lipid Res. 2012, 53(9): 1767-82.
- [14] Davis B, Koster G, Douet LJ, et al. Electrospray ionization mass spectrometry identifies substrates and products of lipoprotein-associated phospholipase A2 in oxidized human low density lipoprotein [J]. J Biol Chem, 2008, 283(10): 6428-6437.
- [15] 陈文强,李宗信,黄小波,等. 颈动脉硬化患者中医证候与血清炎症因子的关系 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16(1): 7-10.
- [16] 任毅,周袁申,张敏州,等. 胸痛心痛患者中医证型与血脂水平、炎症因子的关系探讨 [J]. 时珍国医国药, 2012, 23(4): 977-979.
- [17] 洪永敦,黄衍寿,吴辉,等. 冠心病中医证候与炎症因子关系的临床研究 [J]. 广州中医药大学学报, 2005, 22(2): 81-86.
- [18] 许祥坤,杨强. 丹菱片治疗痰瘀互阻型老年冠心病心绞痛的临床疗效 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(20): 5126-5127.
- [19] 周敏军. 丹菱片治疗痰瘀互阻型冠心病心绞痛患者 70 例临床疗效观察 [J]. 中国民族民间医药, 2013, 22(18): 98.

[修回日期]2015-08-10