

心和颗粒剂对高脂饮食大鼠血管内皮损伤及内皮表达内皮素、粘附分子的影响^{*}

李 晓¹ 李瑞峰² 丁书文¹ 李 莉² 姜 萍¹ 陈 融²

内容提要 目的:研究心和颗粒剂对高脂饮食大鼠血管内皮损伤的保护作用。方法:通过高脂饮食造成大鼠血管内皮损伤,灌药组分为高剂量心和组、低剂量心和组、丹参滴丸组,同时设空白组、高脂对照组,利用内皮细胞铺片技术和免疫组化技术定量检测各组内皮细胞损伤程度及合成分泌内皮素(ET-1)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的阳性细胞数。结果:各组血管内皮损伤程度及内皮分泌 ICAM-1、ET-1 比较,高脂对照组>丹参滴丸组>低剂量心和组>高剂量心和组>空白组。心和颗粒剂无明显降低血脂作用。结论:心和颗粒剂能抑制高脂血症大鼠血管内皮表达 ICAM-1、ET-1,对血管内皮有保护作用。

关键词 心和颗粒剂 内皮损伤 内皮素-1 细胞间粘附分子-1

Effect of Xinhe Granule on Vascular Endothelial Damage and Endothelial Expressed Endothelin and Intercellular Adhesion Molecule-1 in Rats Fed with High Lipid Diet LI Xiao, LI Rui-feng, DING Shu-wen, et al *The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan (250011)*

Objective: To study the protective effect of Xinhe granule (XHG) on vascular endothelial damage in rats fed with high lipid diet. **Methods:** Model of vascular endothelial damage was formed by feeding high lipid diet in rats. The model animal were divided into high dosage XHG group, low dosage XHG group, composite Salvia dripping pellet group and model control group, and a blank (normal) control group was also set up. The degree of endothelial damage and positive cell count of synthesizing and secreting endothelin (ET-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were determined by endothelial cell spreading technique and immunohistochemical technique quantitatively. **Results:** Comparison of the degree on vascular endothelial damage and endothelial secreting ICAM-1 and ET-1 showed model control group > composite Salvia dripping pellet group > low dosage XHG group > high dosage XHG group > blank control group. XHG did not show obvious lowering action on blood lipid. **Conclusion:** XHG could inhibit the endothelial expressed ICAM-1 and ET-1 in hyperlipidemia rats, thus displaying the protective effect on vascular endothelium.

Key words Xinhe granule, endothelial damage, endothelin-1, intercellular adhesion molecule-1

Ross^[1]对 90 年代有关动脉粥样硬化(AS)发病机制进展进行综合评述。动脉粥样硬化病变是由于血管内皮和平滑肌细胞(SMC)等各种因素损伤而产生的过度炎症性—纤维增殖性反应。而粘附是炎症的重要特征,粘附分子可促进炎症细胞粘附在血管内皮上,内皮损伤有利于炎症细胞的聚集,炎症反应又加剧内皮的损伤。本课题通过高脂饮食造成大鼠动脉内皮损伤,利用内皮细胞铺片技术和免疫组化技术对内皮细胞损伤程度及内皮表达细胞间粘附分子(ICAM-1)、内皮素-1(ET-1)的阳性细胞率等进行定量检测,以探讨心和颗粒剂对血管内皮的保护及作用机制。

材料和方法

1 动物与分组 45 只雄性 Wistar 大鼠,体重(200±20)g,由我院动物房提供。随机分为空白组 9 只,实验组 36 只,分笼饲养。空白组喂普通饲料,实验组喂高脂饲料(10% 猪油、4% 胆固醇、0.5% 胆盐、0.2% 硫氧嘧啶加普通饲料配制而成),饲养 1 个月后,查胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C),实验组大鼠血脂水平明显增高。随机分为 4 组(高剂量心和组、低剂量心和组、丹参滴丸组、高脂对照组),并经统计学分析,各组血脂水平之间差异无显著性。

2 药物 实验用药 心和颗粒剂由桂枝、白芍、玄参、连翘等组成,每克相当于原生药 4g,由山东中医药

^{*} 本课题为山东省中医药管理局资助项目(No. 98-9)

1. 山东中医药大学附属医院内科(济南 250011) 2. 山东中医药大学病理生理教研室

大学附属医院制剂室和济南中药厂制作,配成 0.4g/ml 溶液备用。复方丹参滴丸由天津天士力公司生产,配成 1 粒/ml 溶液备用。

3 试剂与仪器 小鼠抗大鼠内皮素-1(美国 Sigma 公司);小鼠抗大鼠 ICAM-1(美国 Chemicoa 公司);即用型 SABC 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒均由武汉博士德公司提供。全自动生化仪为 CX4-CE 型,美国贝克曼公司产品。

4 实验方法

4.1 分组给药 空白组:仅给普通饲料;高剂量心和组:高脂饲料加心和颗粒剂 4g/kg 体重灌胃;低剂量心和组:高脂饲料加心和颗粒剂 2g/kg 体重灌胃;丹参滴丸组:高脂饲料加复方丹参滴丸 5 粒/kg 体重灌胃;高脂对照组:仅给高脂饲料。

4.2 实验方法 上述给药 2 个月后,复查 TG、TC、LDL-C、HDL-C,参照文献^[2]进行内皮细胞铺片,方法如下 (1)各组动物行戊巴比妥钠腹腔麻醉,主动脉插管,以 4% 多聚甲醛恒压(13.3kPa)灌注固定,取胸腹主动脉置于固定液中 1h,沿纵轴剖开血管,按顺序切成 0.8cm 左右长度的动脉段,内皮面朝上,用钢针固定于特氟隆片上。缓冲液冲洗 3 次,3% 过氧化氢孵育 5min,缓冲液冲洗。(2)免疫组化反应:参照试剂盒方法分别于内皮面上滴加一抗(羊抗大鼠 IgG 血清、小鼠抗大鼠 ET-1 血清、小鼠抗大鼠 ICAM-1 血清),分别滴加二抗(生物素标记羊抗小鼠 IgG) SABC 染色,DAB 显色。(3)经 35%~100% 酒精系列脱水,将内皮面朝下压贴在火棉胶片上,放入 35% 酒精内 1h 后,剥离动脉外膜、中膜等内皮下组织,将保留内皮的标本反转压贴在明胶玻璃片上,置中性缓冲固定液 3~4 天,再用醇/醚溶液溶解火棉胶,得到一层腔面朝上的内皮细胞铺片。苏木素复染,酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

5 观察项目及检测方法

5.1 血脂测定 大鼠断尾取血,采用标准酶法,利用全自动生化仪,由本院检验科完成。

5.2 观察内皮细胞形态及计数标记细胞 显微镜目镜下装一刻有 100 个正方格的玻片,这些正方格覆盖镜下 2/3 的视野,用 10× 目镜和 40× 物镜观察内皮细胞铺片。计数每个视野(共 100 个方格)中 10 个方格内细胞总数,将(该数÷10)×100×视野数,便为该段内皮细胞总数。一个蓝色细胞核周围胞浆内有棕黄色颗粒便被认为是阳性细胞,计数每段全部视野内阳性细胞数。每段标记阳性细胞率=该段全部视野内阳性细胞数/该段内皮细胞总数。根据每段阳性细胞

率计算出该动物主动脉内皮阳性细胞率的平均数。IgG 阳性细胞数即可定量表示该段动脉内皮的损伤程度。ET-1、ICAM-1 阳性细胞率可定量表示该段内皮细胞表达 ET-1、ICAM-1 的情况。

5.3 统计学处理 根据每只动物内皮各指标阳性细胞率计算每组动物内皮细胞阳性率的均值和标准差。统计学方法采用方差分析和 *q* 检验。

结 果

1 各组血脂水平比较 见表 1。用药前,可见空白组 TG、TC、LDL-C 水平明显低于各用药组,各用药组之间差异无显著性。用药后,各用药组血脂水平有一定降低,其中高剂量心和组 TC、LDL-C 水平与用药前比较差异有显著性,低剂量心和组 TG 水平差异亦有显著性,说明心和颗粒剂有一定降低血脂作用。但各组之间比较差异无显著性。

表 1 各组用药前后血脂水平比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别		TG	TC	LDL-C	HDL-C
空 白	药前	0.29±0.09	1.31±0.37	0.54±0.19	1.31±0.77
	药后	0.34±0.10	1.51±0.49	0.70±0.15	1.20±0.67
高剂量心和	药前	0.52±0.12	7.44±2.68	5.53±2.17	1.53±0.43
	药后	0.43±0.21	4.10±1.87**	3.21±1.74*	1.50±0.44
低剂量心和	药前	0.64±0.13	7.55±2.38	5.53±1.85	1.61±0.36
	药后	0.48±0.16*	5.91±2.50	4.71±2.20	1.33±0.61
丹参滴丸	药前	0.56±0.15	6.68±1.95	5.18±2.04	1.42±0.40
	药后	0.48±0.28	6.70±3.60	4.50±2.30	1.33±1.39
高脂对照	药前	0.57±0.24	8.45±2.57	6.18±1.86	1.63±0.47
	药后	0.63±0.17	7.21±3.50	5.40±2.20	1.87±1.38

注:与本组用药前比较,**P*<0.05,***P*<0.01,每组鼠数为 9

2 各组内皮细胞阳性率比较 见表 2。IgG 阳性细胞率:低剂量心和组、丹参滴丸组与高脂对照组均高于空白组(*P*<0.01,*P*<0.05),可见高脂饮食造成内皮损伤。高、低剂量心和组与丹参滴丸组均显著低于高脂组,说明两种药物均能减轻高脂血症对内皮的损伤。高、低剂量心和组均低于丹参滴丸,并且高剂量心和组低于低剂量心和组,与空白组相近,说明其保护血管内皮的强度为:高剂量心和颗粒剂>低剂量心和颗粒剂>丹参滴丸。ET-1 阳性细胞率:各用药组与高脂对照组均高于空白组(*P*<0.01,*P*<0.05),说明高脂饮食可促进血管内皮分泌 ET-1,两种药物能抑制其分泌,其抑制强度为:高剂量心和颗粒剂>低剂量心和颗粒剂>丹参滴丸(*P*<0.01,*P*<0.05)。ICAM-1 阳性细胞率:各用药组与高脂对照组均高于空白组(*P*<0.01,*P*<0.05),说明高脂饮食可促进血管内皮分泌 ICAM-1,两种药物均能抑制其分泌,其抑制强度为:高剂量心和颗粒剂>低剂量心和颗粒剂>丹参滴丸(*P*<0.01,*P*<0.05)。

表2 各组动脉内皮 IgG、ET-1、ICAM-1

阳性细胞率水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IgG (%)	ET-1 (%)	ICAM-1 (%)
空白	1.42 ± 2.09	2.40 ± 2.53	0.91 ± 0.97
高剂量心	1.05 ± 0.66	4.38 ± 1.93 *	2.06 ± 1.52 *
低剂量心	2.64 ± 1.73 △	5.31 ± 3.17 * △	4.16 ± 2.46 ** △
丹参滴丸	6.61 ± 3.46 ** △△▲	9.87 ± 4.36 ** △△▲	9.27 ± 3.18 ** △△▲▲
高脂对照	11.61 ± 7.24 ▲▲▲▲	19.88 ± 8.44 ▲▲▲▲	12.78 ± 6.39 ▲▲▲▲

注:与空白组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与高剂量心和组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与低剂量心和组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$;与丹参滴丸组比较,● $P < 0.05$,●● $P < 0.01$;每组鼠数为9

3 内皮细胞铺片镜下所见 正常动脉内皮细胞排列比较整齐,细胞核大多呈长椭圆形,排列方向一致,细胞分布均匀。损伤时,细胞排列不整,细胞疏密不匀,细胞核大小不一,形态各异,极性杂乱,染色深浅不一,可见核固缩(图略)。

讨 论

血管内皮损伤被认为是 AS 发病机制的一个早期关键性环节。对其损伤的观察,用常规的光镜和电镜对组织切片进行形态学研究,难以对内皮损伤作出定量分析,标本制备时也会造成组织损伤,有时又难以与原来的损伤相鉴别。离体内皮细胞在培养液中以一定的速度不断分裂增殖,而实际上在体的大部分内皮细胞是处于静止状态,因此培养的内皮细胞实际也处于人为的“损伤”状态^[2]。

内皮细胞铺片技术可对较大面积的内皮表面作直接观察,结合免疫组化技术,可对内皮损伤的程度及其分泌的多种物质作定量检测。

高脂血症是 AS 发生的主要危险因素之一,血脂增高可促进内皮 ET-1^[3]、ICAM-1^[4]的合成和释放。

在正常情况下,内皮细胞(EC)表面 ICAM-1 呈低表达或不表达,而在损伤或炎症区域内的血管内皮表达增加^[5],ICAM-1 可介导上皮细胞与单核细胞、淋巴细胞和中性粒细胞的粘附,使白细胞固定、变形,形成牢固的粘附。在 AS 形成早期,单核细胞粘附于内皮细胞后,跨膜游走穿过内皮,在许多介质如单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)等作用下,单核细胞转化为巨噬细胞,产生自由基、蛋白酶,氧化低密度脂蛋白,形成泡沫细胞,以后进一步进展成动脉硬化损伤^[6]。ICAM-1在单核细胞和内皮细胞粘附的后期起主要作用,使其牢固的粘附。

免疫组化显示,人类 AS 的冠状动脉组织中 ET-1 含量明显增加^[7],活性明显增强^[8]。ET 可作为趋化因子吸引单核细胞、中性白细胞,可刺激单核细胞产生白介素-6、白介素-8、肿瘤坏死因子、GM-CSF,可刺激中

性白细胞产生过氧化物,从而放大和加重炎症反应,损伤 EC,促进 AS 发展^[9]。

粘附分子促进白细胞粘附,粘附和激活的白细胞如中性粒细胞能够释放细胞毒物质如弹性蛋白酶、花生四烯酸、氧自由基而损害内皮细胞,增加内皮细胞的通透性。内皮损伤,粘附介导,炎症反应相互促进,导致 AS 的形成与发展。本实验结果表明,高脂血症大鼠血管内皮 ICAM-1、ET-1 分泌增加,血管内皮损伤。

保护血管内皮免疫损伤及抑制动脉壁局部炎症反应的发展,有助于 AS 和冠心病的治疗。心和颗粒剂虽有一定降低血脂作用,但与其他组比较差异无显著性。

心和颗粒剂是根据《难经》“损其心者,调其营卫”的治则,并经多年临床摸索确定组方而成,其作用是清热通络、滋阴和营,临床用于治疗冠心病心绞痛出现郁热伤络表现者具有较好的疗效。单纯就本实验分析,血中脂浊凝塞,郁而化热,耗伤脉络营阴,营卫不和。心和颗粒剂在疏通心络的同时,又可滋补营阴,调和营卫,这有可能是本实验结果优于复方丹参滴丸的原因,但其作用机制尚须进一步深入探讨。

参 考 文 献

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801.
2. 胡维诚,徐明义,刘玉梅,等.高胆固醇血症对鹌鹑在体动脉内皮细胞损伤的定量研究. *山东医科大学学报* 1993; 31(3): 185—188.
3. Martin NF, Sqalli HN, Waters LE, et al. Oxidized high-density lipoproteins modulate endothelin secretion by adult bovine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Risk* 1995; 2(3):263.
4. Smalley DM, Lin JHC, Curtis ML, et al. Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb* 1996; 16:585.
5. 张进虎.粘附分子与冠心病. *心血管病学进展* 1997; 18(1): 38—41.
6. 周华东.动脉粥样硬化的发生与细胞间粘附分子. *国外医学老年医学分册* 1997; 18(4):152—155.
7. Jones GT, van Rij AM, Solomon C, et al. Endothelin-1 is increased over lying plaques in human arteries. *Atherosclerosis* 1996; 124(1):25.
8. Hasdai D, Holmes DR Jr, Garratt-KN, et al. Mechanical pressure and strength release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo. *Circulation* 1997; 95(2):357.
9. 孙慧勤.内皮素与白细胞. *国外医学生理病理科学与临床分册* 1999; 19(1):46—47.

(收稿 2000-09-10 修回 2001-04-16)