

# 动脉粥样硬化大鼠“痰瘀”病理演变与 VSMC 肌动蛋白表达的相关性研究

王东生 袁肇凯 陈方平 黄献平

**摘要** 目的 探讨动脉粥样硬化模型大鼠随着造模时间的推移“痰瘀”演变规律。方法 采用高脂饲料喂饲法复制大鼠动脉粥样硬化模型,用生化法及免疫组化方法动态检测血脂、血液流变学、血糖、胰岛素及血管平滑肌细胞(VSMC)肌动蛋白表达的变化。结果 随着动脉粥样硬化大鼠由痰到瘀症状的变化(即血脂、血液流变学、血糖、胰岛素及胰岛素敏感指数等指标均随病情加重而变化),VSMC 肌动蛋白表达逐渐增加。结论 VSMC 肌动蛋白表达是动脉粥样硬化大鼠由痰到瘀的分子机制。

**关键词** 动脉粥样硬化 动物模型 血管平滑肌细胞 肌动蛋白表达

**Relationship between Pathological Development of Phlegm-Stasis and Expression of Actin in Vascular Smooth Muscle Cell in Atherosclerosis Rat Model** WANG Dong-sheng, YUAN Zhao-kai, CHEN Fang-ping, et al *Department of Hematology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha (410008)*

**Objective** To explore the dynamic change of Phlegm-stasis in the rat atherosclerotic model as the time goes on. **Methods** Adopting high fat forage fed to develop the atherosclerotic model in rats, and the changes of blood lipid, hemorrheology, blood glucose, insulin and vascular smooth muscle cell (VSMC) actin expression were detected by biochemical and immunohistochemical assay at various time points after modeling. **Results** The expression of VSMC actin gradually increased along with the change of model rats' Syndrome from Phlegm to stasis, i. e., the change of parameters, including blood lipid, hemorrheologic parameters, blood glucose, insulin and insulin sensitive indexes along with the aggravation of disease. **Conclusion** The expression of VSMC actin could be the molecular mechanism for the Syndrome developing from Phlegm to stasis in atherosclerotic rats.

**Key words** atherosclerosis; animal model; vascular smooth muscle cell; actin expression

由动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)引起的心脑血管病是人类健康的头号杀手,“痰瘀”在 AS 发生发展中起着重要作用;“痰凝”、“血瘀”是 AS 的主要病理改变。我们应用高脂饲料喂饲法复制大鼠 AS 模型,通过动态观察主动脉血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)肌动蛋白表达的变化,探讨“痰瘀”的演变规律,现报告如下。

## 材料与方法

### 1 材料

1.1 动物 健康 Wistar 幼鼠 37 只,鼠龄 40 天,雌雄兼用,体重( $81 \pm 6.3$ )g,由中南大学动物中心提

供,随机分为正常组 8 只,造模组 29 只。

1.2 主要试剂 胆固醇由中国医药集团上海化学试剂公司生产;甲基硫氧嘧啶购自江苏国营武进制药厂;血脂试剂盒、SABC 试剂盒和肌动蛋白试剂盒均为武汉博士德生物工程公司产品;多聚赖氨酸为美国 Sigma 公司产品。

1.3 主要仪器与设备 TG3288 光学读数天平,湘仪天平仪器厂生产;TZK-82A 真空干燥箱,上海市实验仪器总厂生产;LKB 800 石蜡切片机,德国产;SSOOPP 半自动生化分析仪,法国 SECOMAM 公司生产;LPY-N7 血液粘度计,北京普利生公司;IOMED 显微镜,德国莱卡仪器有限公司生产。

### 2 方法

2.1 动物造模 AS 大鼠模型制备参照高脂饲养喂饲法<sup>[1]</sup>,其饲料配制是 4% 胆固醇、10% 猪油、0.2% 甲基硫氧嘧啶、86% 基础饲料(其中面粉 20%、米粉 2%、玉米 20%、麸皮 25%、豆料 20%、骨粉 2%、鱼粉

基金项目 湖南省教育厅重点资助项目(No. 99A03),湖南省卫生厅资助项目(No. 200215),中国博士后科学基金项目(No. 2003033474)

作者单位 中南大学湘雅医院血液科(长沙 410008)

通讯作者:王东生;Tel: 0731-4327214;E-mail: wdsh123@21cn.

万方数据

2% ) 压制成高脂饲料, 进行饲喂。

2.2 动态检测取材 参照文献<sup>[2]</sup>分别于饲喂高脂饲料 17、22、27、32、37、42、47 天每次处死 4 只造模大鼠及 1 只正常大鼠, 用 2% 戊巴比妥钠 45mg/kg 体重腹腔注射麻醉, 固定于鼠板上, 依次切开颈部皮肤, 分离颈动脉, 进行插管, 分别依次抽取 3 管血, 每管约 2.5ml 作检测血脂、血液流变学、血糖、胰岛素之用, 然后打开胸腔, 分离出主动脉, 从主动脉瓣至髂动脉分叉处剪断, 剥去内外膜脂肪, 从主动脉弓处剪去 3cm 长一块, 10% 福尔马林固定液中固定, 制作石蜡切片。

血脂: 应用法国 S. 500p 半自动光谱分析仪和温州东瓯生物工程有限公司提供的试剂盒进行检测, 其中总胆固醇( TC )、甘油三酯( TG )、高密度脂蛋白胆固醇( HDL-C )均用酶法检测, 低密度脂蛋白胆固醇( LDL-C )用 Friedewald 公式计算法:  $LDL = (TC - HDL-C - TG) / 2.2$  (以 mmol/L 为单位)。血糖( FPG )检测仪器及试剂盒来源同上, 用葡萄糖氧化酶法。血液流变学: 全血黏度、血浆黏度均用肝素抗凝, 放入 LPY-NT 血液黏度计上检测; 血小板黏附率: 用枸橼酸钠抗凝, 混匀前在显微镜下计数血小板, 加入 1ml 血放入小烧杯中, 黏附仪转动 15min, 黏附后, 再在显微镜下计数血小板数, 两者血小板数相比为血小板黏附率。血胰岛素( FINS )采用放射免疫法, 使用中国原子能科学院同位素研究所提供试剂盒, 严格按照试剂盒说明书操作。批内变异系数 8.8%, 批间变异系数 11.5%。胰岛素敏感指数( ISI ): 采用公式<sup>[3]</sup>  $ISI = 1 / (空腹血糖 \times 空腹血胰岛素)$  因其为非正态分布, 计算时取自然对数。胰岛素敏感性越小, 胰岛素抵抗越大, 反之亦然。

2.3 肌动蛋白表达测定 按 SABC 法说明书进行免疫组织化学染色, 用免疫组织化学方法测定, 分别以 PBS 和正常小鼠血清替代一抗作为阴性对照。结果用图像分析系统进行肌动蛋白信号传导的形态计量分析。

3 统计学处理 应用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计分析, 计量资料用方差分析, 组间两两比较用  $q$  检验。

## 结 果

1 AS 大鼠“痰瘀”病理演变与血脂的关系 见图 1。在造模的 17 天脂质代谢异常明显, AS“痰凝心脉”模型成功, 与文献报道相符<sup>[4-6]</sup>, 且随着造模时间的推移, 血 TC、TG 逐渐增高, HDL-C 逐渐降低, 体现着“痰浊”量变的过程, 存在于 AS 的始终。

2 AS 大鼠“痰瘀”病理演变与血液流变学的关系

见图 2。随着造模时间的推移, 血液流变性异常逐渐加重, 血液淤滞明显, 造模 22 天已显著异常, 提示在血中之痰浊( 血脂升高 ) 增加时, 伴随着血瘀证的产生, 此即“痰可致瘀”。“瘀”是痰浊产生和发展的结果, 反过来血液的黏稠淤滞又会加重“痰浊”的产生<sup>[7,8]</sup>。表明 AS“痰瘀痹阻”模型成功。

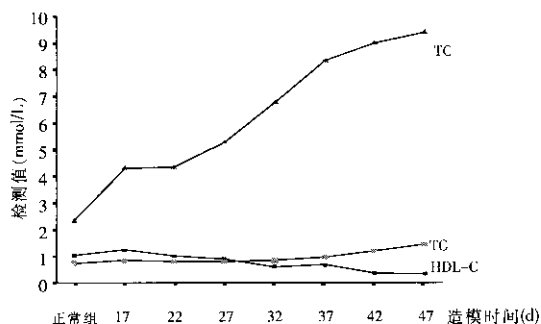


图 1 AS 大鼠“痰瘀”演变与血脂的关系

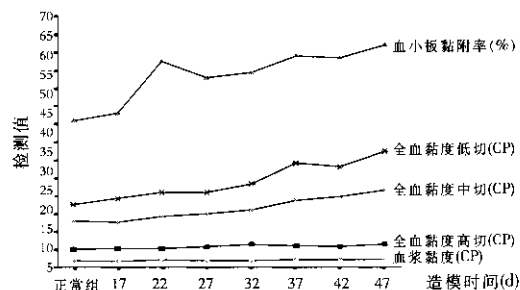


图 2 AS 大鼠“痰瘀”演变与血液流变学的关系

3 AS 大鼠“痰瘀”病理演变与 FPG、FINS 及 ISI 的关系 见图 3。FPG、FINS 的值随着造模时间的增加而增大, ISI 则下降; FINS 造模 17 天已显著异常, 37 天达高峰, 说明胰岛素抵抗现象逐渐加重。

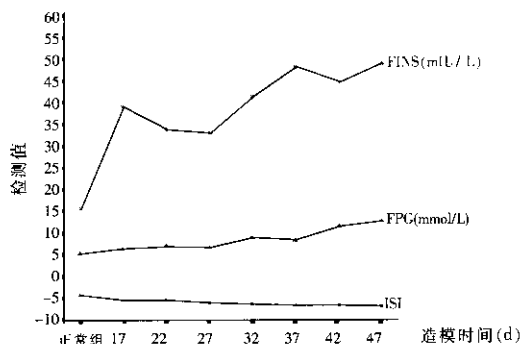


图 3 AS 大鼠“痰瘀”演变与 FPG、FINS 及 ISI 的关系

4 AS“痰瘀”病理演变与肌动蛋白表达的关系 VSMC 经肌动蛋白( actin )免疫组织化学显色后, 免疫反应产物呈棕黄色细颗粒位于胞质内。正常平滑肌细胞 actin 在胞浆中成片均匀表达, 呈弱阳性, 胞核内表达阴性。AS 大鼠 VSMC 的 actin 表达较正常细胞大

大增强,在胞浆中分布不均。部分细胞的 actin 从核旁中心区向细胞周边呈放射状分布,核内强阳性表达,说明 actin 合成增加,并出现了从胞周到核周,胞浆向核内的迁移和再分布,提示其发生了解聚和重排。运用计算分析系统对 VSMC 的 actin 平均光密度值测定,进行统计分析(见图 4)。

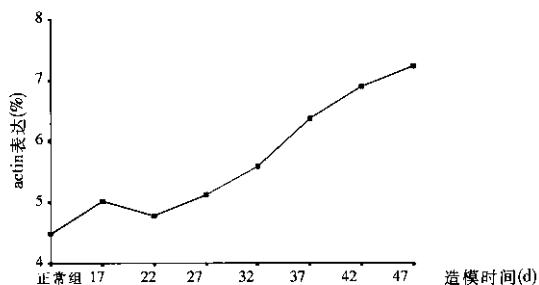


图 4 AS 大鼠“痰瘀”病理演变与 VSMC actin 的关系

VSMC 的 actin 表达呈正常 < 造模 22 天 < 造模 27 天 < 造模 32 天 < 造模 37 天 < 造模 42 天 < 造模 48 天的递进趋势。由此推测 actin 表达的改变可能是参与 VSMC 增殖聚集诱发 AS 的重要因素,而 actin 表达与 VSMC 细胞凋亡。两者在时间点上量的变化有相似的趋势,可能存在一定的联系。

## 讨 论

现代研究表明,血脂代谢异常(TC、TG、LDL-C 升高, HDL-C 下降)是 AS“痰瘀”的主要特征和生化物质基础<sup>[4,9,10]</sup>, AS 血液的高黏滞性,血液流变性及血小板功能改变与中医“痰瘀”病理呈一致性变化<sup>[11-13]</sup>。因此血脂、血液流变学指标的变化可以动态反应 AS“痰瘀”病理的演变规律。本实验在 AS 大鼠进程中,成功塑造痰瘀模型,也证实了 AS 演变中存在“痰瘀”的病理变化。(1)从整体水平看, AS 始终存在着脂质代谢紊乱,胰岛素抵抗(IR),脂质代谢紊乱是“痰浊”的物质基础,血液流变学异常是“痰瘀痹阻”的客观指征。IR 是产生“痰浊”和由“痰”致“瘀”,终止“痰瘀痹阻”的共同土壤,是机体生化物质渐进为“痰瘀”的量变过程。ISI 降低不仅可直接导致 AS,并且还可以通过影响 AS 的其他易患因素间接影响 AS 的发生和发展<sup>[5]</sup>。AS“痰瘀”变化中,血脂、血液流变学、血糖、FINS、IR 均逐渐增加,病情逐渐加重。(2)从蛋白质水平看,由正常到 AS“痰凝”、“痰瘀痹阻”, VSMC actin 表达逐渐增加,它贯穿于 AS 整个过程中,诱发 VSMC 增殖,但以“痰瘀痹阻”细胞凋亡为最严重。微丝(microfilament)是细胞骨架的一种,其主要成分是肌动蛋白,对细胞表面的特征具有很大影响,是维持细胞形状和影响细胞

质运动的重要因素。细胞凋亡是一种固缩性死亡,体积缩小、细胞膜出泡、凋亡小体形成等形态学改变被认为与微丝骨架蛋白的改变密切相关。微丝的肌动蛋白弯曲,被认为可能是凋亡时胞膜出泡的原因<sup>[14]</sup>, actin 是细胞凋亡信号传递过程中的重要因素。本研究可见 AS“痰凝”时见细胞核固缩、凋亡小体形成,胞浆内可见 actin 表达。“痰瘀痹阻”VSMC 明显增殖并伴大量“泡沫细胞”,大量的细胞外基质(包括胶原、弹性纤维、蛋白聚糖及细胞外脂质)均与 actin 表达异常增加相关,与正常组比较差异有显著性。由此可见,肌动蛋白表达异常增加、细胞凋亡严重及凋亡小体清除不足,是 VSMC 增殖的中心环节。

## 参 考 文 献

- 1 苗明山主编. 实验动物和动物实验技术. 北京:中国中医药出版社, 1997:199.  
Miao MS, editor. Experimental animal and animal test technique. Beijing: Chinese TCM Press, 1997:199.
- 2 朱愉, 多秀瀛主编. 实验动物的疾病模型. 天津:天津科学技术出版社, 1997:167.  
Zhu Y, Duo XY, editor. Experimental animal disease model. Tianjing: Tianjing Science and Technology Publishing House, 1997:167.
- 3 李光伟, 潘孝红, Stephen Lillioja, 等. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数. 中华内科杂志 1993; 33(10): 656—660.  
Li GW, Pan XH, Stephen Lillioja, et al. A new index in determining human insulin sensitivity. Chin J Endocrinol 1993; 33(10): 656—660.
- 4 宋剑南, 刘东远, 牛晓红, 等. 高脂血症与中医痰浊关系的实验研究. 中国中医基础医学杂志 1995; 1(1): 49—51.  
Song JN, Liu DY, Niu XH, et al. Exploration studies on the relationship between hyperlipidemia and Phlegm in traditional Chinese medicine. Chin J Basic Med Tradit Chin Med 1995; 1(1): 49—51.
- 5 宋剑南. 从生物化学角度看痰及痰瘀相关. 中国中医基础医学杂志 2000; 3(3): 40.  
Song JN. Exploration on Phlegm and the correlation between Phlegm and blood stasis from biochemical viewpoint. Chin J Basic Med Tradit Chin Med 2000; 3(3): 40.
- 6 宋剑南主编. 中医疾病研究与临床. 北京:中国中医药出版社, 1995:87.  
Song JN, editor. Disease research of TCM and clinics. Beijing: Chinese TCM Press, 1995:87.
- 7 朱晓岚, 郝免昌, 崔志英, 等. 冠心病中医辨证与甲皱微循环和血液流变学之间的相关性探讨. 第一军医大学学报 1990; 3(3): 225.  
Zhu XL, Chen MC, Cui ZY, et al. An approach to relationship

- among traditional Chinese medicinal differentiation of coronary heart disease, nailfold microcirculation and homorrheology. First Mil Med Univ 1990 (3):225.
- 8 黄文权, 罗致强. 冠心病气滞血瘀等证型与血粘度等客观指标的相关性探讨. 实用中西医结合杂志 1990 (5):307.  
Huang WQ, Luo ZQ. Relative study on syndrome of stagnancy of qi and blood stasis and objective target of coronary heart disease. Pract Integr Tradit West Med 1990 (5):307.
  - 9 鲍军, 楼建国, 洪允祥, 等. 54 例冠心病血脂 15 年动态观察及中医辨证治疗相关研究. 中西医结合杂志 1990 (4):206.  
Bao J, Lou JG, Hong YX, et al. Fifteen-year dynamic observation and relative study between identification and treatment according to TCM of blood lipid of 54 cases of coronary heart disease. J Integr Tradit West Med 1990 (4):206.
  - 10 程小曲, 刘茂甫, 周淑意, 等. 痰浊型冠心病与血脂、脂蛋白、载脂蛋白的关系及痰浊形成机理的探讨. 新中医 1994; (3):7—9.  
Cheng XQ, Liu MF, Zhou SY, et al. The relationship between coronary heart disease of phlegm turbidness type and blood fat, lipoprotein and apolipoprotein, and the mechanism of phlegm-turbidness formation. 1994 (3):7—9.
  - 11 陈可冀, 马晓昌. 关于传统血瘀证的现代分类. 中国中西医结合杂志 2000 20(7):487.  
Chen KJ, Ma XC. Commentary on the modern classification of traditional syndrome of blood stasis. Chin J Integr Tradit West Med 2000 20(7):487.
  - 12 周金黄, 王建华主编. 中药药理与临床研究进展. 第 4 册. 北京: 军事医学科学出版社, 1996:125—146.  
Zhou JH, Wang JH, editors. Chinese materia pharmacology and development of clinic research (the Fourth Volume). Beijing: Science Press of Military Medicine, 1996:125—146.
  - 13 Solymoss BC, Marcil M, Chaour M, et al. Fasting hyperinsulinism, insulin resistance syndrome, and coronary artery disease in men and women. Am J Cardiol 1995; 76: 11523—11526.
  - 14 Arends MJ, Mortis R, Wyllie AH. Apoptosis, the role of the endonuclease. Am J Pathol 1990; 136(3):593.

(收稿 2003-08-12 修回 2003-12-20)

## 参附注射液在白血病患者阿霉素化疗中的心肌保护作用

相雪梅<sup>1</sup> 郭萍<sup>2</sup> 闫金松<sup>1</sup>

阿霉素是蒽环类抗肿瘤药物, 由于其明显的心肌毒性, 限制了临床应用。我们于 2001 年 1 月—2003 年 3 月应用参附注射液保护阿霉素所致心肌损害(治疗时以化疗中或化疗结束后出现 ECG 异常者为出现心肌毒性)取得满意疗效, 报道如下。

**临床资料** 120 例经病理学、骨髓穿刺等检查确诊为非何杰金淋巴瘤(NHL)、恶性组织细胞病、复发或难治多发性骨髓瘤(MM)患者。心电图(ECG)异常者已被剔除。按数字表法随机分为两组, 治疗组 60 例, 男 33 例, 女 27 例, 年龄 18~73 岁, 平均(43.4±15.5)岁, 病程 3 个月~3 年, 平均(1.8±0.7)年。对照组 60 例, 男 31 例, 女 29 例, 年龄 18~73 岁, 平均(42.8±16.8)岁, 病程 1 个月~3 年, 平均(1.7±0.8)年。两组阿霉素的总剂量为 45~65mg。两组患者资料比较差异无显著性, 具有可比性。

**治疗方法** 两组恶性组织细胞病、NHL 的治疗应用 CHOP 方案, 复发及难治性 MM 应用 VAD 方案化疗, 同时用辅酶 Q10 10mg 口服, 每日 3 次, 维生素 E 100mg 口服每日 3 次。治疗组在此基础上于化疗期及间歇期给予参附注射液(每毫升含红参 0.5g, 附片 0.2g, 四川雅安三九药业公司生产)40~60ml 加入生理盐水或 5% 葡萄糖注射液 250ml, 每日 1 次静脉滴注, 共 3 周。统计学方法采用  $\chi^2$  检验。

**结果** 120 例以阿霉素为主的化疗患者, 出现 ECG 异常共 36 例, 其中治疗组 10 例(16.7%), 包括房颤 4 例, ST-T 改变 2 例, QTC 延长 1 例, 传导阻滞 1 例, QRS 低电压 2 例。对照组 26 例(43.3%), 包括房颤 8 例, ST-T 改变 4 例, QTC 延长 2 例, 传导阻滞 5 例, QRS 低电压 3 例, 窦速 2 例, 频发室早 2 例。治疗组 ECG 异常发生率显著低于对照组( $P<0.05$ ), 且后者较严重的 ECG 异常(如房颤、传导阻滞)较前者多见。

**讨论** 阿霉素对心肌损伤的机制可能与其能抑制心肌的 DNA、RNA 合成, 导致心肌损害有关。也可能与其在体内代谢过程中产生大量氧自由基有关, 氧自由基可攻击生物膜脂质, 使膜的通透性和流动性发生改变, 造成能量代谢障碍, 导致心肌纤维的变化、萎缩和变性坏死。参附注射液主要成分为红参、附子, 含有多种活性物质如人参皂甙、乌头类生物碱。有研究表明, 人参能提高心肌耐缺氧能力, 促进培养心肌细胞 DNA 合成, 改善心肌组织血流量, 并对心肌超微结构有保护作用。附子中消旋去甲乌头碱是重要的强心成分, 同时对血压有双向调节作用, 它具有激动心脏  $\beta$  受体的效应, 可增快心率、增强心音。两药合用对循环系统有显著作用, 可强心、抗休克, 增加冠脉血流量, 增加心肌血供, 增加心肌收缩力, 降低心肌耗氧量, 改善心功能。这些均有助于改善心肌代谢和增加能量的供应, 拮抗阿霉素心肌毒性的作用, 改善患者的全身状态。以上病例在用药过程中均未出现不良反应, 值得临床推广应用。

作者单位: 1. 大连医科大学第二临床学院(辽宁 116027); 2. 大连珍奥生物工程公司

(收稿 2003-08-01 修回 2004-02-11)