

# 慢性心理应激对血管内皮功能障碍大鼠的影响及通心络的干预作用

吴相春<sup>1</sup> 来 静<sup>2</sup> 吴相锋<sup>1</sup> 贾振华<sup>1</sup> 魏 聪<sup>1</sup> 袁国强<sup>1</sup> 王宏涛<sup>1</sup> 冯书文<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察慢性心理应激对血管内皮功能障碍大鼠的影响及通心络的干预作用,并探讨其机制。  
**方法** 40 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、内皮功能障碍组(HCY 组)、心理应激组(模型组)、通心络组,每组 10 只;用 3% 高蛋氨酸饮食复制内皮功能障碍模型,利用重复束缚法对内皮功能障碍大鼠进行心理刺激,并用通心络(1.2 g/kg)灌胃给药。放免法检测血浆内皮素(ET)、血浆血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)、血清皮质酮(CORT);硝酸还原酶法检测血清一氧化氮(NO);透射电镜观察主动脉组织内皮细胞超微结构变化;ELISA 法检测血清去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)水平。**结果** 与 HCY 组血浆 ET[(161.70 ± 13.96) pg/mL],血清 NO[(26.82 ± 13.03) μmol/L]比较,模型组大鼠血浆 ET[(178.25 ± 21.85) pg/mL]明显升高( $P < 0.05$ ),血清 NO[(24.91 ± 9.95) μmol/L]无明显下降( $P > 0.05$ );CORT、NE、E 明显升高( $P < 0.05$ );内皮细胞超微结构明显损伤。与模型组比较,通心络组血浆 ET[(154.74 ± 13.27) pg/mL]、Ang Ⅱ、CORT、NE、E 明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),血清 NO[(34.44 ± 18.35) μmol/L]明显升高( $P < 0.05$ );内皮细胞超微结构显著改善。**结论** 慢性心理应激可明显加重血管内皮功能障碍大鼠的内皮损伤,通心络具有保护血管内皮结构和功能的作用。

**关键词** 慢性束缚应激;血管内皮结构和功能;下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴;肾素-血管紧张素系统;交感神经系统;通心络

**Effect of Chronic Psychological Stress on Vascular Endothelial Dysfunction Rats and Intervention of Tongxinluo on It** WU Xiang-chun, LAI Jing, WU Xiang-feng, et al *Hebei Academy of Integrated Traditional and Western Medicine, Shijiazhuang (050035)*

**ABSTRACT** Objective To observe the effect of chronic psychological stress on vascular endothelial dysfunction rats and to explore the intervention and mechanism of Tongxinluo (TXL) on it. **Methods** Forty male Wistar rats were randomly divided into the normal control group (with no modeling), the endothelial dysfunction group (the HCY group), the psychological stress group (the model group), and TXL group, ten in each group. Rats in the latter three groups were fed with 3% high methionine diet to duplicate vascular endothelial dysfunction (VED) model. In addition, chronic psychological stress was applied in VED rats using repeated binding method. TXL at the dose of 1.2 g/kg body weight was given by gastrogavage. The plasma endothelin (ET) and angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ), serum cortisone (CORT) were detected by radioimmunoassay. The serum nitric oxide (NO) was detected by nitrate reductase. Ultrastructural changes of aortic endothelial cells were observed by transmission electron microscope. Serum levels of norepinephrine (NE) and epinephrin (E) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Compared with the plasma ET level and the serum NO level in the HCY group (161.70 ± 13.96 pg/mL and 26.82 ± 13.03 μmol/L), the plasma ET level obviously increased (178.25 ± 21.85 pg/mL) ( $P < 0.05$ ) and the serum NO level decreased (24.91 ± 9.95 μmol/L,  $P > 0.05$ ), levels of CORT, NE, and E obviously increased in the model group (all  $P < 0.05$ ). Ultrastructural changes of aortic endothelial cells were obviously injured. Compared with the model group, the plasma ET level (154.74 ± 13.27 pg/mL), Ang Ⅱ, CORT, NE, and E obviously decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the serum NO level obviously increased (34.44 ± 18.35 μmol/L,  $P < 0.05$ ). Ultrastructural changes of aortic endothelial cells were obviously improved. **Conclusions** Chronic psychological stress could obviously aggravate endothelial injury in VED rats. TXL showed protection on the vascular endothelial structure and function.

项目基金:973 国家重点基础研究发展计划资助项目(No. 2005CB523301)

作者单位:1. 河北省中西医结合医药研究院(石家庄 050035);2. 石家庄市第三医院急诊科(石家庄 050000)

通讯作者:吴相春,13903113619, E-mail:wxc2222@163.com

**KEYWORDS** chronic psychological stress; the vascular endothelial structure and function; hypothalamic-pituitary-adrenal axis; renin-angiotensin system; sympathetic nervous system; Tongxinluo

越来越多的研究证实现代生活由于竞争加剧、工作紧张、节奏加快而造成的情绪刺激和心理应激已经成为心脑血管疾病发生、发展的重要因素<sup>[1,2]</sup>。血管内皮是人体重要的内分泌器官,其功能众多,各种损伤刺激均可作用于血管内皮细胞,导致功能的降低或紊乱,出现内皮功能障碍<sup>[3]</sup>。内皮功能障碍是动脉硬化的始动因素,内皮保护研究已成为关注的热点。本研究观察心理因素对血管内皮功能障碍的影响以及通心络的干预作用,并对其机制进行探讨。

### 材料与方 法

1 动物 健康清洁级 Wistar 雄性大鼠,体重 200 ~ 230 g,购于北京维通利华实验动物中心,动物许可证号 SCXK(京)2007 - 0001,饲养在河北以岭医药研究院药理实验室。

2 药物与试剂 蛋氨酸由河北省农科院提供,纯度 99.9%,批号为 B7 NE-05 - 0007-MC02,由河北省实验动物中心制作成 3% 的高蛋氨酸饲料。通心络超微粉由石家庄以岭药业有限公司提供(含有人参、全蝎、蜈蚣、水蛭、蝉蜕、土元、赤芍、冰片等),用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)配制成 0.12 g 生药/mL 的混悬液,4 ℃ 保存备用。血清一氧化氮(NO)试剂盒由南京建成生物试剂公司提供;血浆内皮素(ET)、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)试剂盒由北京普尔伟业生物科技有限公司提供;血清皮质酮(corticoid, CORT)试剂盒北京由北方生物技术研究所提供;去甲肾上腺素(NE)、肾上腺素(E)ELISA 试剂盒由 Rapid Bio Lab. (California, USA)提供。

3 仪器 束缚盒,自制,选择合适的大鼠固定盒,该盒呈筒状,长约 25 cm,筒口外径 7 cm,内径 5 cm,筒内前端置一直径小于筒的内径,并可以前后调节的圆嘴的塑料口,其口为通气口,后端为开关闸门。

4 动物分组及模型建立 健康清洁级 Wistar 雄性大鼠 40 只,将大鼠按体重随机分为正常对照组、内皮功能障碍组(HCY 组)、心理应激组(模型组)及通心络组,每组 10 只。利用 3% 高蛋氨酸饮食 6 周复制内皮功能障碍大鼠模型,利用束缚法对内皮功能障碍大鼠进行刺激并用通心络进行干预,束缚法参照吴淑庆<sup>[2]</sup>、徐志伟<sup>[4]</sup>的方法,实验开始时即将大鼠放入束缚盒内,调节前端活动部位到合适的位置,使大鼠不产生强烈反抗的紧张程度,每天 6 h(9:00 - 15:00),连续 6 周。本研究主要观察慢性心理应激对内皮功能障

碍大鼠的影响及通心络的作用机制,因此未设阳性对照药物组。

5 给药方法 通心络给药量为 1 mL/100 g,相当于 1.2 g 生药/kg(973 课题组内部统一药物用量),灌胃给药,早晨(8:00 - 9:00)进行。正常对照组、HCY 组、模型组给予 0.5% CMC-Na 溶液,按 1 mL/100 g 灌胃;每周 6 次,连续 6 周。

### 6 观察指标及方法

6.1 血管内皮功能 放免法检测血浆 ET 含量(中国人民解放军总医院完成);硝酸还原酶法检测血清 NO 含量(白求恩国际和平医院完成)。

6.2 神经递质 用放免法检测血清 CORT、血浆 Ang Ⅱ 含量(中国人民解放军总医院完成);ELISA 法检测血清 NE、E 含量(白求恩国际和平医院完成)。

6.3 透射电镜观察主动脉内皮细胞超微结构 各组于实验结束后,10% 水合氯醛腹腔注射麻醉,颈总动脉取血后,仔细分离并截取一小段动脉,迅速浸入电镜液中,修成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小组织块,置 4% 戊二醛固定液中 4 ℃ 保存(由河北医科大学基础医学院电镜室协助完成)。

7 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计软件包,各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

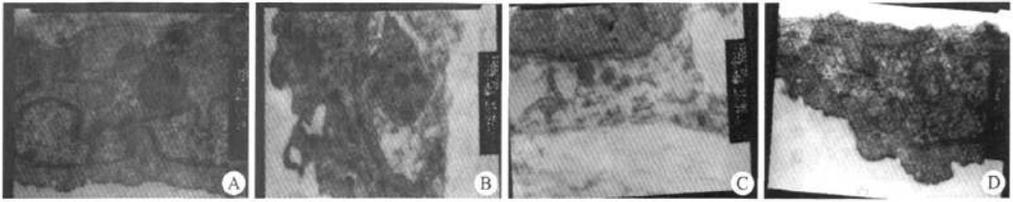
1 各组大鼠 ET 及 NO 比较(表 1) 与正常对照组比较,HCY 组、模型组 ET 水平明显增高,NO 水平明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );与 HCY 组比较,模型组 ET 明显增高( $P < 0.05$ ),而 NO 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与模型组比较,通心络组大鼠 ET 水平明显降低,血清 NO 水平明显升高( $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠 ET 及 NO 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	ET(pg/mL)	NO( $\mu$ mol/L)
正常对照	10	142.91 ± 8.72	45.22 ± 12.42
HCY	10	161.70 ± 13.96*	26.82 ± 13.03**
模型	10	178.25 ± 21.85** <sup>Δ</sup>	24.91 ± 9.95**
通心络	10	154.74 ± 13.27 <sup>Δ</sup>	34.44 ± 18.35 <sup>Δ</sup>

注:与正常对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与 HCY 组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$

2 各组大鼠主动脉内皮细胞超微结构的变化(图 1) 与正常对照组比较,HCY 组内皮细胞超微结



注:A 为正常对照组;B 为 HCY 组;C 为模型组;D 为通心络组

图 1 各组大鼠主动脉内皮超微结构(×20 000)

表 2 各组大鼠 CORT、Ang II、NE 及 E 比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	CORT (ng/mL)	Ang II (pg/mL)	NE (ng/mL)	E (pg/mL)
正常对照	10	25.01 ± 1.83	685.59 ± 253.27	73.15 ± 14.53	146.90 ± 37.15
HCY	10	27.38 ± 2.07*	984.24 ± 248.94*	72.33 ± 15.42	149.37 ± 37.66
模型	10	32.46 ± 2.87*** <sup>△</sup>	1065.73 ± 324.50**	95.56 ± 15.26*** <sup>△</sup>	191.45 ± 41.34*** <sup>△</sup>
通心络	10	28.20 ± 5.08 <sup>▲▲</sup>	562.24 ± 198.61 <sup>▲▲</sup>	76.90 ± 16.98 <sup>▲</sup>	98.03 ± 35.20 <sup>▲▲</sup>

注:与正常对照组比较,\*P<0.05,\*\*P<0.01;与 HCY 组比较,<sup>△</sup>P<0.01;与模型组比较,<sup>▲</sup>P<0.05,<sup>▲▲</sup>P<0.01

构发生明显改变,内皮细胞线粒体大部分嵴和少部分膜融合或消失,粗面内质网轻度扩张,脱颗粒现象明显,吞饮小泡数量减少。与 HCY 组比较,模型组内皮细胞超微结构损伤更加明显,内皮细胞线粒体大部分嵴和少部分膜融合或消失,几乎见不到粗面内质网和吞饮小泡。与模型组比较,通心络组大鼠主动脉组织内皮细胞的超微结构改善,线粒体嵴尚存,内质网无明显扩张,吞饮小泡增加,核糖体数量增多。

3 各组大鼠 CORT、Ang II、NE 及 E 比较(表 2)与正常对照组比较,HCY 组大鼠 CORT、Ang II 增高(P<0.05),而 NE、E 无明显变化(P>0.05);模型组大鼠 CORT、Ang II、NE、E 明显增高(P<0.01)。与 HCY 组比较,模型组 CORT、NE、E 明显升高(P<0.01),Ang II 虽有增高,但差异无统计学意义(P>0.05)。与模型组比较,通心络组大鼠 CORT、Ang II、NE、E 明显降低(P<0.05,P<0.01)。

### 讨 论

社会-心理医学模式强调人的精神、意识、思维活动与机体生理病理状态的互相关联性,强调人与自然和社会环境的互相关联性。应激在心血管发病机制中起着重要作用,各种心理社会因素与心血管疾病如动脉粥样硬化的病因和发病机理有关。动脉的结构改变与血管对刺激的反应性增加有关,反复发生的急性或慢性应激能引起和促进动脉粥样硬化的过程<sup>[5]</sup>。3%蛋氨酸饮食可明显增加内皮结构和功能的损伤<sup>[6]</sup>,本研究结果显示利用 3% 高蛋白饮食可造成血管内皮结构和功能的损伤;利用慢性束缚法对内皮功能障碍大鼠进行心理刺

激,可造成大鼠内皮结构和功能损伤进一步加重。

下丘脑-垂体-肾上腺皮质(hypothalamic-pituitary-adrenal axis,HPA)轴是神经内分泌免疫网络的枢纽。应激反应时,HPA 轴功能增强,往往会导致各种身心疾病<sup>[7]</sup>。肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)是一个应激激素反应系统,与 HPA 轴、交感神经系统(sympathetic nervous system,SNS)关系密切。从中枢到末梢,SNS 与 RAS 之间有相互加强相互易化的正反馈作用。组织局部 RAS 也受交感神经的促发,各种应激与慢性应激时,循环血中及脑、心血管、肾上腺等组织中血管紧张素 II 显著增多,高浓度的 Ang II 对肾上腺糖皮质激素的分泌有直接的刺激作用<sup>[8]</sup>。本研究结果显示内皮功能障碍大鼠存在 HPA 轴、RAS 系统的过度激活,SNS 无明显变化;慢性心理应激可进一步过度激活内皮功能障碍大鼠的 HPA 轴、RAS 系统,过度激活 SNS 系统。

既往多项研究证实通心络对心脑血管疾病的防治具有较好的作用,具有保护血管内皮的完整性,抑制血小板聚集,明显缩小心肌梗死心肌无再流面积,减少再灌注损伤,保护脑微血管内皮细胞和神经元<sup>[9,10]</sup>。中药柴胡疏肝散及逍遥散对慢性应激大鼠 CORT 有降低作用<sup>[11]</sup>,但很少有探讨内皮结构和功能的报道。阿司匹林及他汀类调脂药的冠心病(CHD)常规治疗能明显改善 CHD 患者的血管内皮功能,在常规治疗基础上补充叶酸及 B 族维生素对改善 CHD 患者血管内皮功能的作用不优于 CHD 常规治疗<sup>[12]</sup>。本研究运用通心络进行干预,结果显示通心络能明显改善血管内皮结构和功能,明显抑制过度激活的 HPA 轴、RAS、SNS。

由内皮细胞释放的 NO 是主要的内源性血管舒张系统,其功能与由 SNS 和 RAS 构成的血管收缩机制保持平衡。ET 能促进 Ang II、NE 的分泌,促进 SNS 的兴奋。ET-1 与 Ang II 两者具有自我反馈调节,而且还具有协同作用,在心血管疾病发生发展中起重要作用。并且 ET-1 有加强儿茶酚胺的缩血管作用<sup>[13]</sup>。RAS 在心血管疾病发生发展中发挥重要作用,慢性神经内分泌的激活促进了左室重构和扩张,RAS 的阻断是心力衰竭患者神经内分泌阻断的基础,血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)及血管紧张素受体拮抗剂(ARB)被证明对心血管事件各个阶段均有益<sup>[14,15]</sup>。在心力衰竭中,机体 SNS 激活,增加心肌收缩力,增加心脏搏出量,外周血管收缩以维持平均动脉压,但最终却加重疾病的进展并影响患者的生存。

本研究结果表明,慢性心理应激可明显加重血管内皮功能障碍大鼠血管内皮结构和功能的损伤,过度激活 HPA 轴、RAS、SNS,提示心理应激是加重血管病变的因素之一,提高心理应激能力是预防心血管疾病的措施之一。通心络具有保护血管内皮结构和功能的作用,其机制可能与抑制 HPA 轴、RAS、SNS 的过度激活,调节神经内分泌有关,为进一步研究通心络的作用机制提供了依据。

### 参 考 文 献

- [1] 郭金龙. 应激医学研究进展[J]. 实用医药杂志, 2003, 20(2):151-152.  
Guo JL. The progress of stress medical research[J]. Pract J Med Pharm, 2003, 20(2):151-152.
- [2] 吴淑庆,钱令嘉. 应激大鼠血浆同型半胱氨酸水平的变化及其对心功能的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(3):137-139.  
Wu SQ, Qian LJ. Changes of plasma homocysteine levels stressed rats and its effect on the cardiac function [J]. Chin J Crit Care Med, 2001, 13(3):137-139.
- [3] 李建军. 血管内皮功能障碍及其检测与防治[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(2):175-178.  
Li JJ. Detection and preventive treatment of vascular endothelial dysfunction [J]. Chin J Arterioscl, 2001, 9(2):175-178.
- [4] 徐志伟,严灿,李艳,等. 慢性心理应激大鼠血浆及中枢 β-EP、ACTH 含量的变化及调肝治法方药的影响[J]. 中药药理与临床, 2002, 18(5):37-39.  
Xu ZW, Yan C, Li Y, et al. The changes of β-endorphine and adrenocorticotrophin in brain and plasma of rats with chronic psychological stress and the effect of therapy of Gan-regulating prescription [J]. Pharm Clin Chin Mater Med, 2002, 18(5):37-39.
- [5] 田英,傅明德. 心理应激在心血管病发生中的病理生理机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(2):245-246.

- Tian Y, Fu MD. Pathological and physiological mechanisms of psychological stress in the development of cardiovascular disease [J]. Chin J Arterioscl, 2005, 13(2):245-246.
- [6] 张向阳,加娜提,爱华. 高同型半胱氨酸血症大鼠血浆一氧化氮和内皮素 1 水平的变化:血管内皮功能损伤验证[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(44):8242-8246.  
Zhang XY, Jia NT, Ai H. Changes of plasma nitric oxide and plasma endothelin-1 levels in hyperhomocysteinemia rats: verification of endothelial dysfunction [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res, 2007, 11(41):8242-8246.
- [7] 韩晓春. 下丘脑-垂体-肾上腺在慢性应激过程中的调节作用[J]. 医学综述, 2006, 12(2):73-75.  
Han XC. Regulatory role of HPA in the chronic stress reaction [J]. Med Recapitul, 2006, 12(2):73-75.
- [8] 万瑜,杨钢,万曙霞,等. 肾素-血管紧张素系统-应激激素反应系统[J]. 生理学报, 1996, 48(6):521-528.  
Wan Y, Yang G, Wan SX, et al. Renin-angiotensin-system stress hormone response system [J]. Acta Physiol Sin, 1996, 48(6):521-528.
- [9] 刘芳,李金,王新德. 通心络胶囊对脑梗死患者血小板聚集功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(4):304-306.  
Liu F, Li J, Wang XD. Effect of Tongxinluo Capsule on platelet aggregation in patients with cerebral infarction [J]. Chin J Integr Tradit West Med, 2008, 28(4):304-306.
- [10] 吴以岭,主编. 络病理理论科学求证[M]. 北京:科学出版社, 2007:67, 1410.  
Wu YL, editor. Scientific confirmation of collateral diseases theory [M]. Beijing: Science Press, 2007:67, 1410.
- [11] 敖海清,徐志伟,严灿,等. 柴胡疏肝散及逍遥散对慢性心理应激大鼠血清皮质酮及胃肠激素的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18(4):288-291.  
Ao HQ, Xu ZW, Yan C, et al. Effect of Chaihu Shugan Powder and Xiaoyao Powder on serum corticosterone and gastrointestinal hormones of chronic psychological stress rats [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharm, 2007, 18(4):288-291.
- [12] 谢莲娜,王丽君,孙玉兰. 补充叶酸及 B 族维生素对冠心病患者血管内皮功能的影响[J]. 心脏杂志, 2008, 20(2):184-186.  
Xie LN, Wang LJ, Sun YL, et al. Effects of supplementation of folic acid and B Vitamins on endothelial function in coronary heart disease patients [J]. Chin Heart J, 2008, 20(2):184-186.
- [13] 温进坤,韩梅. 血管平滑肌细胞[M]. 北京:科学出版社, 2005:191-275.  
Wen JK, Han M, editors. Vascular smooth muscle cells [M]. Beijing: Science Press, 2005:191-275.
- [14] Chrysant SG, Chrysant GS, Chrysant C, et al. The treatment of cardiovascular disease continuum: focus on prevention and RAS blockade [J]. Curr Clin Pharmacol, 2010, 5(2):89-95.
- [15] Werner CM, Böhm M. The therapeutic role of RAS blockade in chronic heart failure [J]. Ther Adv Cardiovasc Dis, 2008, 2(3):167-177.

(收稿:2010-05-14 修回:2010-09-21)