文章编号:1000-5404(2012)18-1853-04

论著

野马追提取液对动脉粥样硬化家兔炎症反应的防治作用

王柯静[1],程 渝[1],周远大[2] (400013 重庆,重庆市妇幼保健院药剂科[1];400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院临床药理研究室[2])

[摘要] **目的** 观察野马追提取液(lindley eupatorium herb,LEH)对动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)家兔模型血管壁炎症的影响。**方法** 将36只家兔完全随机分为6组:正常对照组,模型组,阳性药物组及野马追大、中、小剂量组,分别给予基础饲料,高脂饲料及高脂饲料分别添加辛伐他汀2.2 mg/kg,野马追8.34、4.17、2.08 g/kg处理。分别于6、10周检测血浆中脂质及炎性标志物C反应蛋白(C-reactive protein ,CPR)、血管内皮舒张因子一氧化氮(NO)的水平,病变组织中血管细胞黏附分子-l(vascular cell adhesion molecule-1,VCAM-1) mRNA的表达;测量粥样斑块的面积及厚度。**结果** 模型组血脂水平及主动脉粥样硬化斑块面积与正常组比较有明显升高[第10周TC:(1.39±0.23)mmol/L *vs* (46.30±6.73) mmol/L, $P<0.05$;脂质斑块面积占主动脉面积比:0% *vs* (89.61±7.85)%, $P<0.05$];野马追各组血浆中CPR及组织中VCAM-1 mRNA的表达均明显降低[(5.15±1.42)、(5.69±1.45)、(6.36±1.43)mg/L *vs* (8.34±1.85)mg/L,$P<0.05$],NO含量明显升高[(117.41±9.61)、(87.87±13.47)、(64.34±11.18)μmol/L *vs* (47.29±8.29)μmol/L,$P<0.05$]。**结论** 野马追对动脉粥样硬化有良好的防治作用,其机制可能与抗炎相关。

[关键词] 野马追;动脉粥样硬化;炎症;C反应蛋白;血管细胞黏附分子-1
[中图法分类号] R282.71;R285.5;R543.5 [文献标志码] A

Lindley eupatorium herb extract prevents and attenuates vascular inflammation reaction in atherosclerosis rabbits

Wang Kejing[1], Cheng Yu[1], Zhou Yuanda[2] ([1]Department of Pharmacy, Chongqing Health Center for Women and Children, Chongqing, 400013; [2]Department of Clinical Pharmacology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of lindley eupatorium herb (LEH) extract on the vascular inflammation in rabbit model with atherosclerosis. **Methods** A total of 36 rabbits were randomly divided into 6 groups, normal control group (treated with normal diet), model group, positive control group and LEH groups. Rabbit model with atherosclerosis were established by high fat diet. The animals from the positive control group was treated with 2.2 mg/kg simvastatin which was mixed in the diet, and those of LEH groups were treated with LEH at 8.34, 4.17 and 2.08 g/kg respectively. The serum levels of blood fat, C-reactive protein (CRP) and NO were detected in 6 and 10 weeks. The plaque area and thickness of aorta were measured with morphometry analysis when rabbits were killed after 10 weeks treatment. The damaged segments of abdominal artery were harvested for mRNA expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by RT-PCR. **Results** Compared with normal group, the serum level of blood fat and plague area in the model groups were significantly increased (at the 10th week, TC: 1.39±0.23 *vs* 46.30±6.73 mmol/L, $P<0.05$; the ratio of lipid plaque area:0% *vs* 89.61±7.85 %, $P<0.05$); the levels of CRP in the serum and mRNA expression of VCAM-l in the tissue of medication administration teams were significantly decreased (5.15±1.42, 5.69±1.45, 6.36±1.43 *vs* 8.34±1.85 mg/L, $P<0.05$). NO content were significantly increased (117.41±9.61, 87.87±13.47, 64.34±11.18 *vs* 47.29±8.29 μmol/L, $P<0.05$). **Conclusion** LEH exerts protective and therapeutic effect on atherosclerosis by decreasing the level of specific markers of inflammation.

[**Key words**] lindley eupatorium herb; atherosclerosis; inflammation; C-reactive protein; vascular cell adhesion molecule-1

Corresponding author: Zhou Yuanda, Tel: 86-23-89012346, E-mail: zhouyuanda001@163.com

[通信作者] 周远大,电话:(023)89012346,E-mail:zhouyuanda001@163.com

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是导致心脑血管疾病的最危险的原因之一,从天然植物中寻找一种安全有效、毒副作用少的抗AS药物已成为人们关注的焦点。野马追(*lindley eupatorium herb*,LEH)为菊科植物轮叶泽兰(*eupatorium lindleyanum*, DC)的全草,其止咳、化痰平喘、降血压等传统功效已得到广泛认可[1]。本研究室率先对野马追单味药在降脂方面的作用作了一定研究,发现其具有良好的降低血胆固醇、甘油三酯功效[2],因此,本实验拟对野马追在防治AS的作用及机制方面做进一步的探讨。Ross[3]的炎症反应学说提出AS是血管内皮细胞和平滑肌细胞受到各种危险因子刺激后血管局部产生的一种慢性炎症性增生反应。本实验旨在观察AS与炎症的关系及野马追对AS的防治作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

野马追提取液由重庆市中药研究院药物化学研究所秦剑提供,批号:090831,棕色味苦,每毫升含野马追生药20 g,闭存放于4℃冰箱。辛伐他汀(京必舒新),白色片剂,规格10 mg/片,由浙江京新药业股份公司生产。总胆固醇(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)及一氧化氮(NO)测定试剂盒由南京建成试剂公司提供。总RNA提取试剂Tripure购自Roche公司;逆转录酶试剂盒购于Promega公司、RNAguard及Ex *Taq* DNA聚合酶为TaKaRa公司产品。主要仪器为日立7060全自动生化分析仪;Beckman-Coulter UniCal DxC800生化分析仪(美国BECKMAN公司);MAStercycler Gradient梯度PCR仪(德国Eppendorf公司)。

1.2 动物分组及AS动物模型制备方法

雄性家兔36只,体质量(2.0±0.2)kg,由重庆医科大学实验动物中心提供。基础饲料适应性喂养1周后,完全随机分为6组:正常对照组(A)、模型组(B)、阳性药物组(C)及野马追提取液大(D)、中(E)、小剂量组(F),每组6只。正常对照组予以正常兔颗粒饲料喂养;其余组均予以自制的高脂饲料喂养,配方(质量分数)为:84%基础饲料,10%蛋黄粉,5%猪油,1%胆固醇[4-5]。阳性药物组及野马追大、中、小剂量组在喂饲高脂饲料基础上分别加用辛伐他汀2.2 mg/kg,野马追8.34、4.17、2.08 g/kg处理。其用量参照文献[1-2]计算。单笼喂养,每只兔每天均定量给予饲料120 g,基本保证每只兔每天摄入足够药量,自由饮水,造模时间均为10周。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 血脂、C反应蛋白(C-reactive protein,CPR)及一氧化氮(NO)测定 于实验开始6周及10周末经兔耳缘静脉取血,离心分离血浆,酶法测定总胆固醇(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),硝酸还原酶法测定一氧化氮(NO)的水平,ELISA法检测血浆CRP浓度。

1.3.2 主动脉斑块覆盖面积及斑块厚度的测定 动物喂养至第10周,禁食8 h,2%戊巴比妥麻醉2 ml/kg麻醉。沿腹正中线切开,剥离从主动脉弓到髂总动脉分叉处的动脉组织,纵向剖开,生理盐水洗净后苏丹Ⅲ染色,观察主动脉内膜的变化,运用Image pro plus 4.5图像分析软件对AS斑块面积及厚度进行测量,参考文献[6]计算粥样病变面积占主动脉总面积的百分比。

1.3.3 主动脉斑块组织学观察 各组取主动脉弓处横切面,置于10%甲醛溶液固定,作HE染色,进行形态学分析比较。

1.3.4 主动脉斑块血管细胞黏附分子-I(vAScular cell adhesion molecule-1,VCAM-1)mRNA表达的测定 家兔处死后,取靶病变血管组织,提取组织中RNA,逆转录cDNA后采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)的方法测定组织中VCAM-1 mRNA表达[7-8],以GAPDH为对照。VCAM-1引物序列为5′-GAACACTCTTACCTGTGCACAGC-3′和5′-GCCATCCTCATAGCAATTAAGGTGAG-3′,产物长度为567 bp。GAPDH引物序列为5′-GTGAAGGTCGGAGTCAACG-3′和5′-GGTGAAGACGCCAGTGGACTC-3′,产物长度为299 bp。反应条件为94 ℃预变性4 min后,94 ℃变性40 s→60 ℃复性1 min→72 ℃复性1 min→72 ℃延伸1 min,共32个循环。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,紫外线条带放射显像仪显像,图像自动分析系统进行电泳条带强度测定,计算PCR产物相对量。

1.4 统计学处理

用SPSS 10.0软件处理数据,结果均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差分析,组间两两比较采用LSD检验。

2 结果

2.1 野马追提取液对血脂及血浆CRP、NO的影响

实验结果显示6周时野马追提取液各剂量组血脂均有下降但下降幅度不及他汀组显著,10周时野马追大剂量组的血脂水平基本降至与他汀组持平,可能与中药起效较为和缓有关;10周时,各给药组血浆中CPR水平较模型组均有不同程度的下降,NO水平较模型组均有升高,其中他汀组的NO水平显著增加($P<0.05$)。见表1、2。

表1 野马追提取液对各组高脂血症兔血脂指标的影响(mmol/L, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	TC		TG		HDL-C		LDL-C	
	6周	10周	6周	10周	6周	10周	6周	10周
正常对照组	1.46±0.31	1.39±0.23	0.60±0.09	0.82±0.15	0.73±0.06	0.72±0.14	0.84±0.39	0.70±0.04
模型组	24.05±3.48	46.30±6.73	2.63±0.52	6.85±1.36	0.70±0.47	0.76±0.36	12.38±3.14	16.26±4.85
阳性药物组	16.90±2.87	19.97±3.61	1.12±0.38[a]	2.33±0.77	1.18±0.58	1.55±0.43	7.26±2.12	9.25±1.84
LEH大剂量组	18.76±3.05	24.85±4.53	1.94±0.54[a]	2.23±0.84	1.80±0.26	1.68±0.23	8.45±1.43	10.95±1.73
LEH中剂量组	19.75±4.33[a]	28.13±4.93	2.36±0.79	3.35±1.08[a]	0.99±0.33	1.09±0.43[a]	9.26±2.87[a]	12.71±2.34
LEH小剂量组	21.14±4.01	36.45±5.34[a]	2.52±0.53	4.59±1.65	0.83±0.31	0.87±0.57	10.87±3.74	14.29±2.91[a]

a:$P<0.05$, 与模型组比较

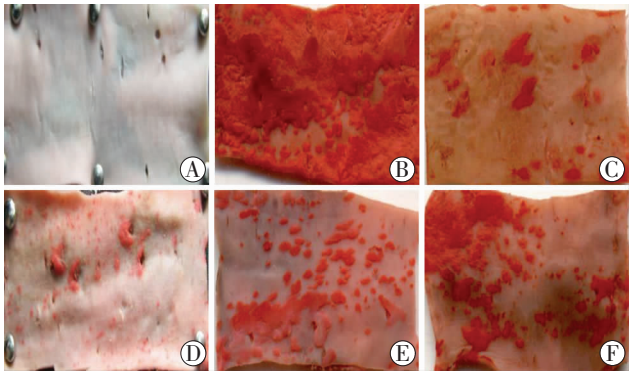
表 2　野马追提取液对各组动脉粥样硬化家兔血浆 CPR 及 NO 水平的影响（$\bar{x} \pm s$）

组别	CPR(mg/L)	NO(μmol/L)
正常对照组	2.24 ± 0.74	54.04 ± 6.37[a]
模型组	8.34 ± 1.85	47.29 ± 8.29
阳性药物组	4.27 ± 1.01	125.81 ± 11.08
LEH 大剂量组	5.15 ± 1.42[a]	117.41 ± 9.61[a]
LEH 中剂量组	5.69 ± 1.45[a]	87.87 ± 13.47[a]
LEH 小剂量组	6.36 ± 1.43[a]	64.34 ± 11.18[a]

a：$P < 0.05$，与模型组比较

2.2　野马追提取液对主动脉斑块面积及厚度的影响

苏丹Ⅲ染色后，正常组主动脉内膜光滑，未见脂质斑块及脂纹变化。其余各组均可观察到不同程度的红色斑块，呈点、斑、条状，病变以主动脉弓处最为严重。模型组主动脉内膜几乎完全被粗糙不平隆起的脂质斑块覆盖，并融合成片。野马追提取液大剂量组主动脉内膜仅见芝麻大小的斑块，多分布于动脉分支开口处，见图 1。各组主动脉斑块面积及厚度见表 3。



A：正常对照组；B：模型组；C：阳性药物组；D：LEH 大剂量组；E：LEH 中剂量组；F：LEH 小剂量组

图 1　苏丹Ⅲ染色后各组兔主动脉内膜的形态变化

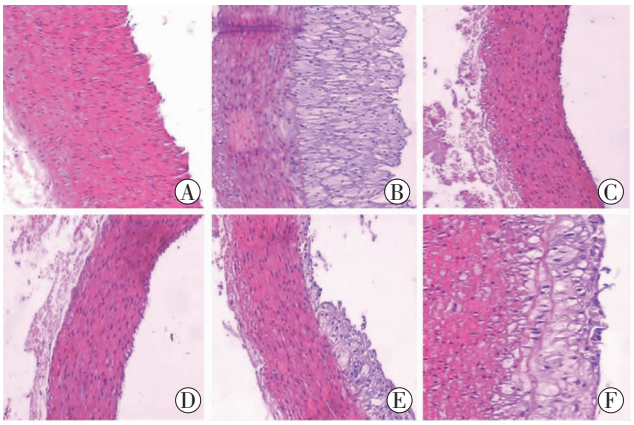
表 3　各组主动脉斑块覆盖面积及斑块厚度比较（$\bar{x} \pm s$，$n = 6$）

组别	脂质斑块面积占主动脉面积比(%)	斑块最大厚度(mm)
正常对照组	0	0
模型组	89.61 ± 7.85	245.8 ± 34.6
阳性药物组	14.72 ± 4.07	169.73 ± 24.1
LEH 大剂量组	16.97 ± 5.49	139.54 ± 17.8
LEH 中剂量组	34.51 ± 9.58[a]	177.59 ± 24.3[a]
LEH 小剂量组	42.32 ± 6.85[a]	216.94 ± 34.6

a：$P < 0.05$，与模型组比较

2.3　野马追提取液对主动脉内膜病理变化特点

正常组动物主动脉壁内皮完整无损伤，模型组内膜显著增厚，可见大量的泡沫细胞呈多层排列于血管内膜，巨噬细胞和淋巴细胞浸润增多；阳性药物组内膜轻度增厚，可见少量泡沫细胞形成；野马追大剂量组内皮细胞基本完整，内膜中有散在的泡沫细胞，见图 2。

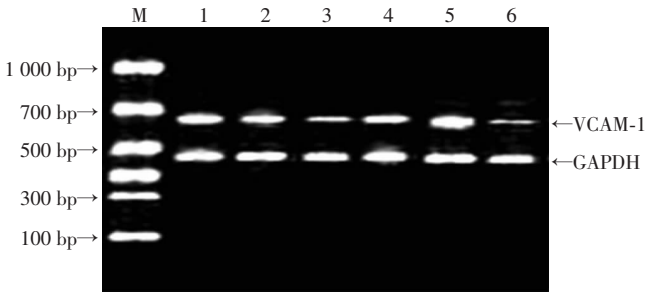


A：正常对照组；B：模型组；C：阳性药物组；D：LEH 大剂量组；E：LEH 中剂量组；F：LEH 小剂量组

图 2　各组 AS 兔主动脉内膜的病理变化（HE × 10）

2.4　野马追提取液对组织中 VCAM-1 mRNA 表达的影响

正常组仅有少量 VCAM-1 mRNA 表达，高脂组 VCAM-1 mRNA 表达明显升高，野马追提取液各组 VCAM-1 mRNA 水平较高脂组明显降低。见图 3。



M：标准；1：LEH 小剂量组；2：LEH 中剂量组；3：LEH 大剂量组；4：阳性药物组；5：模型组；6：正常对照组

图 3　各组动脉粥样硬化兔 VCAM-1 逆转录产物琼脂糖凝胶电泳结果

3　讨论

炎症在 AS 的发生、发展中起着主要作用[3]。针对 AS 的炎症机制进行研究和干预，是目前心血管领域的热点之一。野马追提取液抗 AS 作用机制可能与以下因素有关。①抑制炎症介质的产生及黏附分子的表达。CRP 是机体非特异性炎症反应的敏感标志物，其水平不但能反映与动脉粥样硬化相关的炎症程度，同时也是促进动脉粥样硬化发生、发展的炎症因子[9]，CRP 可促炎症介质如 TNF-α、IL-1、IL-6 的释放，能激活内皮细胞的核转录因子 NF-κB，促进平滑肌细胞的迁移和增生等。研究[10]表明 CRP 可刺激血管内皮细胞，调节单核细胞趋化蛋白-1 的分泌，诱导活化的

内皮细胞黏附分子的表达,主要有 P-selection、E-Selection、ICAM-1、VCAM-1 等。它们共同介导了血管内皮细胞与单核细胞和白细胞的黏附,白细胞向内皮下间隙的游走[11]。VCAM-1 属免疫球蛋白超家族,是极迟抗原-4(VLA-4)的配体,主要表达在活化的血管内皮细胞表面,它主要强化淋巴细胞、嗜碱性粒细胞和嗜酸性粒细胞穿出血管壁到达炎症部位的过程[12]。本研究表明,野马追提取液可显著降低实验性 AS 家兔血浆 CRP 生成和血管壁组织 VCAM-1 表达,在该方面野马追大剂量组与阳性药辛伐他汀类的作用相当,进而推测野马追提取液可能通过降低 CPR 的水平进而降低多种炎症介质的分泌和释放;通过下调 VCAM-1 的表达从而抑制炎症细胞的黏附、迁移和聚集,阻断炎症反应的始动和进程。②改善血管内皮功能:血管内皮功能障碍被认为是 AS 的始动因素,缺血、高血脂、氧化应激等各种危险因素导致内皮功能失调,表现为血管舒缩功能障碍,内皮通透性增加,血小板黏附聚集,白细胞附壁及细胞因子的产生等,进而形成血栓,诱发炎症反应。炎症状态又可进一步加重内皮细胞的损伤[13],炎症介质促进内皮细胞的活化,产生各种细胞因子、趋化因子及细胞黏附分子。Hingorani 等[14]指出,内皮功能障碍可能是各种危险因素导致内皮细胞损伤的炎症前状态,是导致 AS 发展的关键步骤。NO 是最强的内源性血管舒张因子,目前不少证据表明 NO 是一种重要的抗炎物质[15-16]。内皮功能受损时 NO 的生成或生物利用度下降,可作为 AS 最早的标志。实验表明野马追能升高血浆中 NO 水平,野马追提取液可能通过增加内皮衍生 NO 的生成,增强局部产生的缓激肽对内皮依赖性舒张作用,从而改善内皮细胞扩张功能的失调起到控制炎症,延缓甚至逆转动脉粥样硬化的进展,但在该方面野马追提取液各剂量组不及他汀类药物作用明显。③调节脂蛋白的代谢:高胆固醇血症、高甘油三酯血症是最早被公认致 AS 的重要危险因素。二级干预实验也表明:降低血 TC、LDL-C 水平能显著减缓肢体和冠状粥样斑块的形成。本实验结果也与前期结果相符合,野马追各剂量组能有效抑制 TC 及 LDL 增高,对于 TG 则影响不大。

本实验表明野马追抗 AS 的作用主要是通过调节脂质代谢、减轻血管壁炎症反应,保护血管内皮细胞综合发挥的。野马追来源广泛,容易获得,且价格便宜,疗效确定,因此有希望成为一种新的防治高血脂和 AS 的药物。

参考文献:

[1] 周远大, 陈康, 何海霞, 等. 野马追一般药理作用实验研究[J]. 中国药房, 2005, 16(2): 94-96.

[2] 周远大, 江舟, 何海霞, 等. 野马追对大、小鼠实验性高脂血症的防治作用[J]. 中国药房, 2007, 18(3): 178-179.

[3] Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.

[4] 方显明, 吴韫宏, 彭忠异. 安心颗粒防治家兔动脉粥样硬化的病理形态学观察[J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(23): 2196-2198.

[5] 张伟, 李锋, 王玉琴, 等. 二苯乙烯苷对实验性动脉粥样硬化大鼠血脂和炎症因子的调节作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(5): 516-520.

[6] 孙康云, 顾振纶, 谢梅林. 消瘀降脂胶囊防治兔高脂血症及动脉粥样硬化的形成[J]. 心脏杂志, 2006, 18(4): 439-441.

[7] 徐全胜, 张家明, 李宾公, 等. 辛伐他汀对冠心病患者内皮祖细胞增殖的影响及其机制初步探讨[J]. 心血管康复医学杂志, 2007, 16(3): 271-274.

[8] 张子新, 赵卫华, 宋丽新, 等. 阿奇霉素对动脉粥样硬化家兔炎症反应的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14(7): 601-603.

[9] Hwang S J, Ballantyne C M, Sharrett A R, *et al*. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study[J]. Circulation, 1997, 96(12): 4219-4225.

[10] Pasceri V, Willerson J T, Yeh E T. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells[J]. Circulation, 2000, 102(18): 2165-2168.

[11] Pasceri V, Cheng J S, Willerson J T, *et al*. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs[J]. Circulation, 2001, 103(21): 2531-2534.

[12] Khan B V, Harrison D G, Olbrych M T, *et al*. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(17): 9114-9119.

[13] Hill J M, Zalos G, Halcox J P, *et al*. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. N Engl J Med, 2003, 348(7): 593-600.

[14] Hingorani A D, Cross J, Kharbanda R K, *et al*. Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans[J]. Circulation, 2000, 102(9): 994-999.

[15] Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis?[J]. Circulation, 2004, 109(21 Suppl 1): II27-II33.

[16] 商蓉郁, 曾惠, 赵清, 等. 不同水质和饲料对兔动脉粥样硬化形成的影响[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(20): 2211-2215.

(**收稿**:2012-03-31;**修回**:2012-04-25)

(编辑 张 维)