

- nist antibodies imp rove function, electrophysiologic and pathologic features in Trembler mice [J]. Exp Neurol, 2010, 224 (2):495-506.
- [8] 魏良浩,潘庆,张跃明.《金匱》肾气丸对阿尔茨海默病模型大鼠额叶皮质神经元 NT-3 表达的影响[J]. 中国中医急症, 2013,22(2):211-213.
- [9] 鲍伟,于晓辉,万小平. TrkB 信号转导通路在肿瘤中的作用[J]. 上海交通大学学报(医学版),2012,32(12):1652-1655.
- [10] 梅旭晖,纪倩,姚斌彬,等. 推拿对坐骨神经损伤大鼠神经生长因子及其受体 p75NTR 的影响[J]. 中华中医药杂志, 2013,28(7):1994-1997.
- [11] 梅旭晖,纪倩,吴剑聪,等. 推拿对坐骨神经损伤大鼠 TrkA 的影响[DB/OL]. 中国科技论文在线 2013[2013-10-12]. http://www. paper. edu. cn/releasepaper/content/201302-194
- [12] 梅旭晖,纪倩,姚斌彬,等. 推拿对坐骨神经损伤大鼠 p75NTR 的影响[DB/OL]. 中国科技论文在线 2013[2013-10-12]. http://www. paper. edu. cn/releasepaper/content/201303-298
- [13] Gillespie L N. Regulation of axonal growth and guidance by the neurotrophin family of neurotrophic factors[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2003, 30 (10): 724-733.
- [14] Ivanov S, Panaccione A, Brown B, et al. TrkC signaling is activated in adenoid cystic carcinoma and requires NT-3 to stimulate invasive behavior[J]. Oncogene,2013,(32)32:3698-3710.

(收稿日期:2013-10-12)

(本文编辑:黄凡)

额尔敦—乌日勒对兔动脉粥样硬化易损斑块模型血清超敏 C 反应蛋白及相关炎症因子的影响

乌兰其其格 麻春杰 呼日乐巴根 海英 布和朝鲁 白龙 邸彦清

【摘要】 目的 观察额尔敦—乌日勒对兔动脉粥样硬化易损斑块模型血清超敏 C 反应蛋白 (high sensitivity C-reactive protein,hs-CRP)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein -1, MCP-1)、细胞间粘附因子 (intercellular adhesion molecule,ICAM-1)、血管粘附因子 (vascular adhesion molecule-1,VCAM-1) 的影响,以探讨额尔敦—乌日勒改善动脉粥样硬化易损斑块病变的可能机制。**方法** 50 只雄性新西兰大耳白兔随机分为 4 组,分别为正常组、模型组、额尔敦—乌日勒组及辛伐他汀组。通过高脂饲料、免疫损伤结合经股动脉球囊拉伤建立家兔动脉粥样硬化易损斑块模型,实验第 8 周开始给药至 24 周,取血检测炎症因子 hs-CRP、MCP-1、ICAM-1 和 VCAM-1;取主动脉,光镜观察组织结构。**结果** 额尔敦—乌日勒组主动脉病变程度相对较轻,纤维帽厚度与内中膜厚度比值高于模型组 ($P < 0.01$),同时能明显降低动脉粥样硬化家兔血清 hs-CRP、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 含量 ($P < 0.01$)。**结论** 额尔敦—乌日勒可能通过抑制炎症反应,降低 hs-CRP、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 上升水平来发挥抗动脉粥样硬化 (atherosclerosis,AS) 的形成、发展和稳定易损斑块的作用。

【关键词】 额尔敦—乌日勒; 动脉粥样硬化; 高敏 C 反应蛋白; 炎症因子; 兔

【中图分类号】 R29 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2014.03.005

Influences of serum hs-CRP and relevant inflammatory factors on rabbit atherosclerotic vulnerable plaque model with Eerdun-wurili Wulanqige, MA Chun-jie, Hurilebagen, et al. College of Basic Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
Corresponding author: MA Chun-jie, E-mail: 13514819729@163.com

基金项目:国家自然科学基金(81160464)

作者单位:100029 北京中医药大学基础医学院[乌兰其其格(博士研究生)];内蒙古医科大学蒙医学院(乌兰其其格、呼日乐巴根、海英、布和朝鲁、白龙),中医学院(麻春杰、邸彦清)

作者简介:乌兰其其格(1979-),女,2011 级在读博士研究生,实验师。研究方向:蒙药药理研究。E-mail:mywulan2008@163.com

通讯作者:麻春杰(1956-),女,教授,博士生导师,主任医师。研究方向:中(蒙)医药防治心脑血管疾病的研究。E-mail:13514819729@163.com

【Abstract】 Objective To observe the influences of serum high sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), intercellular adhesion molecule (ICAM-1), and vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) on rabbit model of atherosclerotic vulnerable plaque with Eerdun-wurili and explore its possible mechanism. **Methods** Fifty New Zealand rabbits were randomly divided into 4 groups: the normal control group, the model group, the Eerdun-wurili group and the simvastatin group. The model was established by high fatty diet feeding, combined with immune injury and femoral arterial balloon tearing. From the 8th week the medication was given and the levels of serum hs-CRP, MCP-1, ICAM-1 and VCAM-1 were measured at the 24th week of experiment. Tissue structure of aortic were observed under light microscope. **Results** Aortic lesions is relatively milder in the Eerdun-wurili group and the fibrous cap thickness and Intima media thickness ratios in the Eerdun-wurili group were higher than those of model group; besides, the levels of serum hs-CRP, ICAM-1, VCAM-1 and MCP-1 were decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** Eerdun-wurili could prevent AS formation and stabilize atherosclerosis vulnerable plaque. It acts by suppressing the inflammation reaction.

【Key words】 Eerdun-wurili; Atherosclerosis; High-sensitivity C-reactive protein; Inflammatory factors; Rabbits

目前大量的研究证据表明动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性血管炎症疾病^[1-3]。炎症反应贯穿于动脉粥样硬化斑块形成、发展和破裂的全过程。炎性细胞因子介导的炎症反应在动脉粥样硬化的发生发展中起了极其重要的作用。前期研究表明传统蒙药额尔敦—乌日勒具有消退早期动脉粥样硬化的作用^[4]。本研究主要观察额尔敦—乌日勒对家兔动脉粥样硬化易损斑块病理、血清炎症因子高敏 C 反应蛋白(high sensitivity C-reactive protein, hs-CRP)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、细胞间粘附因子(intercellular adhesion molecule, ICAM-1)、血管粘附因子(vascular adhesion molecule-1, VCAM-1)的影响,并探讨额尔敦—乌日勒改善动脉粥样硬化易损斑块病变的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

50 只健康雄性新西兰大耳白兔,体重(2.0 ± 0.2)kg,由北京市海淀区兴隆实验动物养殖厂提供,许可证编号:SCXK(京)2011-0006,分笼饲养,自由饮水。实验在内蒙古医科大学蒙医药研究院动物中心完成。

1.2 实验用药

额尔敦—乌日勒,批号:121164,2 g/10 粒,30 粒/瓶,内蒙古蒙药股份有限公司生产。辛伐他汀片,批号:121002,20 mg/片,12 片/盒,山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司生产。戊巴比妥钠,批号:F20030816,中国医药集团上海试剂公司。牛血

清白蛋白(Albumin, bovine, fraction V)CAS Number: 9048-46-8,内蒙古呼和浩特市泽生试剂公司。肝素钠注射液,批号:20110313,1.25 万 U/2 ml,天津生物化学制药有限公司生产。青霉素钠,批号:Y1207622,160 万 U/瓶,华北制药股份有限公司生产。

1.3 主要试剂与仪器

hs-CRP 试剂盒,货号:CSB-E06847Rb, MCP-1 试剂盒,货号:CSB-E06921Rb, ICAM-1 试剂盒,货号:CSB-E06974Rb, VCAM-1 试剂盒,货号:CSB-E10092Rb,武汉华美生物工程有限公司;ST16R 高速离心机,美国热电公司;MULTISKAN MK3 酶标仪,美国热电公司;日本 OLYMPUS-BX51 生物显微镜(奥林巴斯);HMIAS-2000 高清晰度彩色病理图像分析系统;DH4000A 电热恒温培养箱,天津泰斯特仪器有限公司。

1.4 方法

1.4.1 动物分组及模型制备 50 只新西兰大耳白兔适应性饲养 1 周后,随机分为正常对照组 10 只及造模组 40 只。正常对照组,每只喂饲普通饲料 150 g/天,造模组喂饲由 86% 普通饲料 + 1% 胆固醇 + 8% 蛋黄粉 + 5% 猪油配置的高脂饲料 100 g/只/日(早),普通饲料 50 g/只/日(晚)直至 24 周取材。第 2 周造模组经兔耳缘静脉一次性注射牛血清白蛋白 500 mg/只,第 4 周用球囊拉伤术损伤动脉^[5]。所有实验兔均单笼饲养,自由饮水。第 8 周末,将所有实验兔禁食 12 小时以上,经耳缘静脉抽取空腹血检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)及低密度脂蛋白胆固醇(low density

lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平,结果显示造模组血脂水平均显著升高,随机选取 4 只造模组兔处死后,剥离主动脉全长,剖开血管壁均可见明显隆起斑块,表明兔 AS 模型建立成功。将造模组兔子随机分为模型组、辛伐他汀组(简称辛伐组)、额尔敦—乌日勒组(简称额尔敦组)。

1.4.2 给药方法 将辛伐他汀片和额尔敦—乌日勒研磨、分别用蒸馏水制备混悬液,用灌服给药。参照动物与人体体重等效剂量折算系数,依据每只实验兔的体重,计算出相应的给药剂量。每天 1 次,连续给药 16 周。每 2 周称量体重一次,据此调整给药剂量。其中辛伐他汀为阳性对照药,模型组用等容积的蒸馏水灌胃。

1.4.3 主动脉病理形态学检查 第 24 周实验结束取血后处死动物,取主动脉弓段约 1 cm 放入 10% 中性甲醛溶液中固定、梯度酒精脱水、透明、石蜡包埋,切片,切片厚度 5 μm 作 HE 染色,光镜下观察受损血管组织形态学改变,同时采用 HMIAS-2000 高清晰度彩色病理图像分析系统测量主动脉壁纤维帽厚度(fiber cap thickness, FCT)、内中膜厚度(intima-media thickness, IMT),并计算纤维帽厚度与内中膜厚度比值(FCT/IMT)。

1.4.4 血清指标检测 第 24 周,用 50 ml 注射器体外心脏采血,放入 50 ml 的离心管中,静置 1 小时后,4000 r/min 离心 15 分钟后取血清,-20℃ 冰箱保存,待测试。hs-CRP、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 测定均采用酶联免疫吸附(双抗体夹心)法,根据试剂盒提供的试剂与实验步骤要求进行操作,用 MULTI-SKAN MK3 酶标仪完成测定。

1.5 统计学处理方法

应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,两组均数间比较采用 t 检验,所有实验数据用均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 主动脉病理形态学观察

正常对照组家兔主动脉血管内膜比较光滑,无粥样病损,无脂质斑块形成。光镜下内皮细胞完整,内弹力膜清晰,未见断裂,内膜无增厚,中膜平滑肌细胞排列有序,外膜纤维结缔组织未见异常。模型组家兔主动脉内膜粗糙不平,肉眼可见浅黄色条纹或大小不等斑块隆起,光镜下可见血管内膜增

厚明显,内皮细胞脱落,粥样斑块形成,内皮下见脂质浸润,脂质核心大,脂质核心内大量泡沫细胞及炎性细胞浸润,中膜平滑肌细胞增殖,向内膜迁移,斑块内可见新生的小血管。相比之下,给药组(额尔敦—乌日勒组和辛伐他汀组)家兔主动脉病变程度相对较轻,光镜下可见主动脉内皮有不同程度损伤,脱落,内皮细胞下有少量泡沫细胞聚集,平滑肌排列比较规则。同时实验结果显示,额尔敦—乌日勒组 FCT、FCT/IMT 比值均高于模型组($P < 0.01$),与辛伐他汀组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 额尔敦—乌日勒对 AS 家兔主动脉病理形态的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FCT(μm)	IMT(μm)	FCT/IMT(%)
模型组	10	54.78 \pm 6.96	994.18 \pm 46.71	6.23 \pm 0.67
额尔敦组	10	84.12 \pm 8.56 ^a	899.92 \pm 34.08 ^a	10.17 \pm 1.03 ^{ab}
辛伐组	9	77.63 \pm 6.89 ^a	879.50 \pm 56.33 ^a	9.08 \pm 0.48 ^a

注:与模型组比较,^a $P < 0.01$;与辛伐他汀组比较,^b $P < 0.05$

2.2 血清炎症因子的影响

实验结果显示,模型组家兔血清 hs-CRP、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 水平较正常明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,额尔敦—乌日勒能明显降低动脉粥样硬化家兔 hs-CRP、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 水平,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与辛伐他汀组比较,在降低模型组家兔的 hs-CRP 和 MCP-1 方面亦具有一定优势($P < 0.05$),见表 2。

3 讨论

已经有许多研究表明,血清炎症因子 hs-CRP、ICAM-1、VCAM-1 和 MCP-1 等可作为反映 AS 斑块稳定程度的炎症标志物,是心血管疾病危险预测的重要指标。hs-CRP 多方面参与了动脉粥样硬化机制,如能够调节巨噬细胞摄入低密度脂蛋白,有助于泡沫细胞的形成;激活粥样斑块内的补体系统导致斑块不稳定,增强不稳定性斑块的血管活性等。hs-CRP 可以直接诱导动脉粥样硬化的发展,因此 CRP 是心血管疾病的独立危险因素^[6]。hs-CRP 诱导内皮产生单核细胞趋化蛋白(MCP-1),上调 ICAM-1、VCAM-1,介导巨噬细胞摄入天然 LDL,使单核细胞组织因子增加,引起动脉内膜损伤,最终导

表 2 额尔敦—乌日勒对 AS 家兔血清 hs-CRP、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	hs-CRP (pg/ml)	MCP-1 (pg/ml)	ICAM-1 (ng/ml)	VCAM-1 (pg/ml)
正常组	8	14.639 ± 2.320	17.537 ± 2.333	1.709 ± 0.258	131.734 ± 14.187
模型组	10	53.699 ± 3.323 ^a	79.422 ± 3.769 ^a	4.856 ± 0.399 ^a	466.298 ± 10.228 ^a
额尔敦组	10	19.953 ± 1.227 ^b	31.072 ± 2.500 ^{bc}	3.550 ± 0.419 ^b	326.088 ± 21.221 ^b
辛伐组	9	23.647 ± 1.887 ^b	35.852 ± 2.107 ^b	3.228 ± 0.294 ^b	282.399 ± 33.780 ^b

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$;与辛伐他汀组比较,^c $P < 0.05$

致斑块和血栓形成^[7]。大量实验病理学和分子生物学的研究资料证明,ICAM-1 和 VCAM-1 可介导白细胞与内皮细胞的滚动和稳定黏附,并继而在单核细胞趋化蛋白(MCP-1)等炎症因子的协助下穿越血管表层,启动局部的炎症反应,因而在动脉粥样硬化发展中起着关键性的作用。MCP-1 作为趋化因子家族中的一员,在 AS 病变早期,主要是趋化单核细胞向血管内膜迁移,活化为巨噬细胞,在 AS 晚期,则对血管平滑肌细胞的增生和向血管内膜的迁移具有趋化增殖的作用,同时通过诱导组织因子的表达,促进血栓形成^[8]。

近年来蒙医药对冠心病的研究,不论在病因病机、临床症状治疗及蒙医分型研究方面均取得了一定的成果。传统蒙药额尔敦—乌日勒是蒙医治疗“白脉病”(类似于脑出血、脑血栓、神经损伤、神经根炎等脑神经系统疾病)、“协日乌素”(风湿、类风湿等病)、“萨病”(中风或脑卒中)的常用蒙成药,由珍珠、石膏、丁香、红花、土木香、木香、檀香、地锦草、沉香、麝香、牛黄、水牛角、桐麻子、白芷等 29 味纯天然药材组成。近些年对额尔敦—乌日勒的研究逐步深入,临床研究表明其治疗脑梗塞、脑血栓、冠心病、心绞痛等心脑血管疾病疗效显著^[9-11]。

本研究结果显示,传统蒙药额尔敦—乌日勒能明显降低动脉粥样硬化家兔血清 hs-CRP、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 含量,差异具有统计学意义($P < 0.01$);与辛伐他汀组比较,在降低模型组家兔的 hs-CRP 和 MCP-1 面亦具有一定优势($P < 0.05$)。从病理形态学检查看,能增加斑块表面纤维帽厚度、改善纤维帽与内中膜厚度比值。总之以上结果表明额尔敦—乌日勒可能通过抑制炎症反应,降低 hs-CRP、ICAM-1、VCAM-1、MCP-1 上升水平来发挥抗 AS 的形成、发展和稳定易损斑块的作用。

参 考 文 献

- [1] Saito M, Ishimitsu T, Minami J, et al. Relations of plasma high sensitivity C-reactive protein to traditional cardiovascular risk factors[J]. Atherosclerosis, 2003, 167(1):73-79.
- [2] Sesso HD, Buring JE, Rifai N, et al. C-reactive protein and the risk of developing hypertension [J]. JAMA, 2003, 290(22):2945-2951.
- [3] Magyar MT, Szik szai Z, Balla J, et al. Early-on set carotid atherosclerosis is associated with increased intima-media thickness and elevated serum levels of inflammatory markers[J]. Stroke, 2003, 34(11):58-63.
- [4] 麻春杰,董平,韩雪梅,等. 额尔敦—乌日勒在家兔动脉粥样硬化斑块消退中的作用及其对炎症因子的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代, 2011, 13(5):894-897.
- [5] 张军平,彭立,李良军,等. 实验性兔主动脉粥样硬化易损斑块模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(3):161-165.
- [6] 胡大军,刘剑萍,廖昆,等. 低分子肝素对兔动脉粥样硬化易损斑块模型血清 CRP、IL-6 的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(18):4468-4469.
- [7] 谢心,吴坚,竺春玲,等. 益气养阴方对动脉粥样硬化大鼠免疫炎症因子 hs-CRP、sVCAM-1、sICAM-1 影响的实验研究[J]. 江苏中医药, 2013, 45(3):73-74.
- [8] 张娜,李林森. 炎症与动脉粥样硬化关系的新认识及有关中药的研究进展[J]. 药物评价研究, 2013, 36(4):302-303.
- [9] 咏梅. 蒙医心刺痛·血性心刺痛的诊疗方案[J]. 中国民族医药杂志, 2010, 16(7):32-33.
- [10] 瑞图雅,金花,包淑芝. 蒙医辨证论治劳力型心绞痛 68 例临床报告[J]. 中国民族医药杂志, 2005, 5(4):4-5.
- [11] 嘎·毕雅图,乌云高娃,萨日娜. 珍宝丸为主治疗高血压所致脑出血 11 例[J]. 内蒙古民族大学学报(蒙医药学·蒙古文版), 2002, 12(1):75-76.

(收稿日期:2013-12-19)

(本文编辑:蒲晓田)