

额尔敦—乌日勒对动脉粥样硬化家兔血管内皮因子内皮素、血小板活化因子的影响

郝蔷薇 麻春杰 乌兰其其格 曾寒泊 万宇 田海广

【摘要】 目的 通过观测额尔敦—乌日勒对动脉粥样硬化家兔血管内皮因子内皮素 (endothelin, ET)、血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF) 的影响, 明确其稳定斑块的作用机制。**方法** 将 50 只家兔, 随机分为正常组和造模组。正常组 10 只不进行造模, 普通饲料喂养; 造模组 40 只采用高脂饮食喂养、免疫损伤、球囊拉伤术复合因素造模, 建立家兔动脉粥样硬化易损斑块模型。8 周造模成功后, 将最终造模成功的 29 只家兔随机分为模型组 ($n=10$)、额尔敦—乌日勒组 ($n=10$)、辛伐他汀组 ($n=9$), 额尔敦—乌日勒组和辛伐他汀组分别给予额尔敦—乌日勒、辛伐他汀进行干预, 24 周后取材, 运用酶联免疫吸附法和免疫组化方法检测各组家兔血管内皮因子 PAF 和 ET 的浓度及表达情况。**结果** 与模型组比较, 额尔敦—乌日勒显著降低血清 ET、PAF ($P<0.01$), 在降低 ET 水平上优于辛伐他汀组; 与模型组比较, 额尔敦—乌日勒组能降低主动脉 ET、PAF 表达 ($P<0.01$), 在降低 ET 表达上优于辛伐他汀组 ($P<0.05$)。**结论** 额尔敦—乌日勒具有改善动脉粥样硬化血管内皮功能的作用。

【关键词】 额尔敦—乌日勒; 动脉粥样硬化; 血管内皮因子; 内皮功能; 易损斑块

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.12.003

Research on the effect of Eerdun-wurili on rabbit atherosclerotic vulnerable plaque endothelial function HAO Qiang-wei, MA Chun-jie, WULAN Qi-qige, et al. The Traditional Chinese Medicine Department of Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010030, China

Corresponding author: MA Chun-jie, E-mail: 13514819729@163.com

【Abstract】 Objective To explore the effects and possible mechanisms of Eerdun-wurili in stabilizing the vulnerable plaques using a rabbit model of AS vulnerable plaque. **Methods** We take 50 male New Zealand white rabbit which were underwent balloon-induced abdominal aortic wall injury and were fed a high cholesterol diet for 8 weeks to establish rabbit atherosclerosis model vulnerable plaques; Rabbits were then randomly divided into three groups: the normal group ($n=10$; General diet without any model); the model group ($n=10$; without any treatment); the Eerdun-wurili group ($n=10$; using Eerdun-wurili for treat) and the simvastatin group ($n=10$; using simvastatin for treat). 24 weeks later, the rabbits were sacrificed to observe concentrations and expressions of ET; PAF expressions were measured by means of Enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA) and immunohistochemistry. **Results** Elisa test results showed that Eerdun-wurili can significantly reduce the levels of ET and PAF ($P<0.01$); Rabbit aortic immunohistochemistry results showed: compared to the model group, ET and PAF expressions in the Eerdun-wurili group were significantly reduced ($P<0.01$); and the ET expression is significantly less than the sim-

基金项目: 国家自然科学基金(81160464)

作者单位: 010030 呼和浩特, 内蒙古医科大学研究生学院 [郝蔷薇 (硕士研究生)、麻春杰、乌兰其其格、曾寒泊、田海广]; 广州中医药大学研究生学院 (万宇)

作者简介: 郝蔷薇 (1990-), 女, 2013 级在读硕士研究生。研究方向: 中蒙药防治心脑血管疾病。E-mail: 13214068300@163.com

通讯作者: 麻春杰 (1965-), 女, 博士, 教授, 主任医师, 博士生导师。研究方向: 中蒙药防治心脑血管病、脾胃病。E-mail: 13514819729@163.com

vastatin group ($P < 0.05$). **Conclusion** Eerdun-wurili may though reducing the levels of Endothelial Factor ET and PAF to play the role of anti-AS vulnerable plaques.

[Key Words] Eerdun-wurili; Atherosclerosis; Vascular endothelial factor; Endothelial function; Vulnerable plaques

正常的血管内皮细胞可调节血管紧张度,维持血管结构,并可分泌抗凝、抗血小板物质和纤溶蛋白,防止炎症细胞向血管壁黏附聚集^[1]。血管内皮细胞分泌的多种因子,是检测动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)斑块易损的重要指标。血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)和内皮素(endothelin, ET)是反映血管内皮功能的主要标志物。前期研究表明,额尔敦—乌日勒能够有效干预动脉粥样硬化的形成和发展^[2-3],促进 eNOS 基因的表达,增加其活性,升高内皮细胞生成的一氧化氮水平^[4-5],但额尔敦—乌日勒稳定 AS 家兔易损斑块的作用机制与其对血管内皮因子 PAF、ET 的影响具有怎样的联系,国内外尚未有报道,故笔者团队对此进行研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物与药物

50 只健康雄性新西兰家兔[由北京市海淀区兴隆实验动物养殖厂提供,许可证号:SCXK(京)2011-0006]。额尔敦—乌日勒(内蒙古蒙药股份有限公司,生产批号:120706;规格 2 g/10 粒);辛伐他汀(山东鲁抗医药集团赛特有限责任公司,生产批号:20120703,国药准字 H20083840,规格 20 mg/片);青霉素钠注射液(华北制药股份有限公司,国药准字 H13020655,生产批号:20120716,规格 160 万单位/瓶×50 瓶/盒);肝素钠注射液(天津生化药业有限责任公司生产,国药准字 H12020505,生产批号:20121007,规格 1.25 万单位/2 mL,2 mL/支,2 mL×10 支/盒)。

1.2 试剂与仪器

PAF、ET 的 Elisa 试剂盒由上海西塘生物科技有限公司提供(生产批号分别为 F20412、F20030);PAF、ET-1 一抗、二抗均由北京博奥森生物技术有限公司提供(一抗生产批号:bs-1119R,bs-0954R,二抗生产批号:SP-0023)。Thermo 酶标仪(美国,型号:Multiskan Ascent),DK-8D 数显恒温水浴锅(中国金坛,型号:DK-8D),电热恒温培养箱(中国苏州,型号:DNP9272),高压灭菌锅(中国上海,型号:YXQ-LS-75SII),生物显微镜和成像系统(中国南京,型

号:BM2000 型),石蜡包埋机(德国,型号:EG1150H+C),高速立式离心机(日本,型号:CF16RXii)

1.3 造模及分组

普通饲料喂养 1 周适应环境后,随机分为正常组 10 只,造模组 40 只。造模组高脂饲料喂养 4 周,实验第 2 周给造模组的家兔耳缘静脉注射牛血清白蛋白生理盐水溶液,4 周后对造模的家兔进行球囊拉伤手术^[6]。于实验第 8 周通过检测家兔血脂水平和主动脉病理形态学确定 AS 易损斑块形成,证实造模成功,并将造模组最终存活的家兔($n = 29$)完全随机分组,分为模型组($n = 10$)、额尔敦—乌日勒组($n = 10$)和辛伐他汀组($n = 9$)。

1.4 给药方法及标本制备

正常组和模型组均灌服等容积的蒸馏水;额尔敦—乌日勒组按家兔体质量给予额尔敦—乌日勒 0.4 g/(kg·d);辛伐他汀组按家兔体质量给予辛伐他汀 5 mg/(kg·d),各药分别用蒸馏水制成混悬液喂饲。1 次/天,至 24 周实验结束。第 24 周末心脏采血,3000 rpm 离心 10 分钟分离血清;同时,随机空气栓塞处死每组家兔,迅速取出主动脉,生理盐水清洗后,中性缓冲福尔马林溶液固定。

1.5 实验指标检测

1.5.1 家兔血清 ET、PAF 含量检测 PAF、ET 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 Multiskan Ascent 酶标仪完成测定。

1.5.2 家兔主动脉 ET、PAF 的表达 按照试剂说明书上步骤采用 ABC 法检测,两抗体均用抗体稀释液稀释 200 倍后使用,光镜下观测家兔主动脉血管内皮因子 PAF、ET-1 的表达。采用图像分析系统对免疫组化染色切片半定量分析,每组随机选取两张切片,每张标本 400 倍镜下选取 5 个不重复的视野,测量其阳性染色部位的平均光密度值(average optical density, AOD),作为每张标本的阳性定量指标。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,若符合正态性分布和方差齐性,则采用单因素方差分析,两组间的比较采

用 LSD 检验;若不符合正态分布或方差齐性,则采用秩和检验,以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组家兔血清 ET、PAF 浓度

家兔血清 ET 符合正态分布,但方差不齐,进行秩和检验分析显示,模型组家兔血清 ET 水平较正常组明显升高($P<0.01$),差异具有统计学意义;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 ET 水平($P<0.01$),差异具有统计学意义。实验家兔血清 PAF 数据不符合正态分布,进行秩和检验分析显示,与正常组相比,模型组 PAF 浓度显著升高($P<0.01$),差异具有统计学意义($P<0.01$);与模型组相比,额尔敦—乌日勒能显著降低血清 PAF 的浓度($P<0.01$),差异具有统计学意义。见表 1。

表 1 各组家兔血清 ET、PAF 浓度的比较($\bar{x}\pm s$)

分组	<i>n</i>	ET($\mu\text{g/L}$)	PAF($\mu\text{g/mL}$)
正常组	10	117.02 \pm 16.69	19.17 \pm 2.13
模型组	10	168.00 \pm 27.71 ^a	29.33 \pm 3.89 ^c
额尔敦—乌日勒组	10	125.01 \pm 10.84 ^{bc}	22.22 \pm 1.80 ^b
辛伐他汀组	9	158.55 \pm 16.64	23.58 \pm 1.48

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

2.2 各组家兔主动脉 ET、PAF 的表达

光镜下可见主动脉血管 ET、PAF 胞浆内的棕黄色颗粒信号增强为阳性表现。光镜下可见,ET 在正常组血管内皮细胞中表达不明显,模型组、额尔敦—乌日勒组及辛伐他汀组表达增强,呈棕黄色,与正常对照相比,模型组棕黄色颗粒表达强烈。免疫组化染色半定量分析染色切片中 ET 的 AOD 值符合正态性,方差齐,采用单因素方差及 LSD 比较。结果显示,模型组家兔主动脉 ET 的 AOD 值比正常组明显升高($P<0.01$),差异具有统计学意义;与模型组相比,额尔敦—乌日勒组 ET 的 AOD 值显著降低($P<0.01$),差异具有统计学意义;与辛伐他汀组相比,额尔敦—乌日勒组 ET 的 AOD 值显著降低($P<0.05$),额尔敦—乌日勒组在降低主动脉血管内皮 ET 的表达上具有一定的优势。见表 2、图 1。

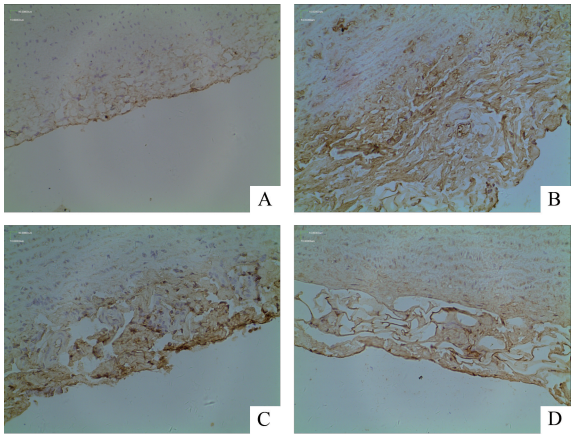
光镜下观测 PAF 染色切片结果显示,与正常对照相比,模型组有强烈的棕黄色颗粒表达,阳性部位在内皮细胞的胞浆、胞膜及胞质里均可见。额尔敦—乌日勒组及辛伐他汀组两组 PAF 阳性表达主

要位于胞浆,胞膜仅有少量表达。染色切片中 PAF 的 AOD 值符合正态分布,方差齐,采用单因素方差分析及 LSD 比较。与正常组相比,模型组家兔主动脉血管 PAF 的 AOD 值与正常组相较明显升高, ($P<0.01$),差异具有统计学意义,与模型组相比,额尔敦—乌日勒组主动脉 PAF 的 AOD 值显著降低 ($P<0.01$),差异具有显著性。见表 2、图 2。

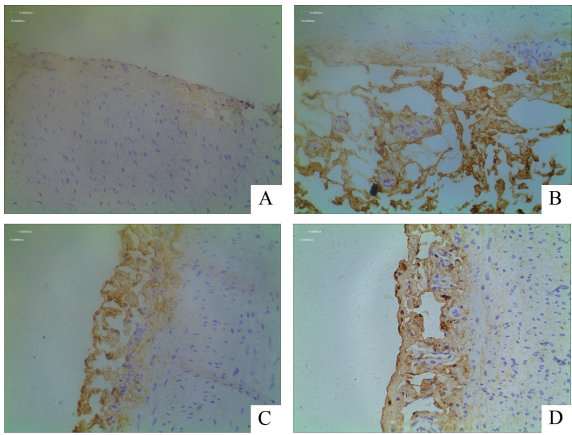
表 2 各组家兔主动脉 ET、PAF 免疫组化染色 AOD 值的比较($\bar{x}\pm s$)

分组	<i>n</i>	ET	PAF
正常组	10	0.0811 \pm 0.0138	0.0851 \pm 0.0021
模型组	10	0.1605 \pm 0.0119 ^a	0.1901 \pm 0.1735 ^a
额尔敦—乌日勒组	10	0.1060 \pm 0.0140 ^{bc}	0.1327 \pm 0.0112 ^b
辛伐他汀组	9	0.1219 \pm 0.0158	0.1267 \pm 0.0138

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



A 正常组 B 模型组 C 额尔敦—乌日勒组 D 辛伐他汀组
图 1 各组家兔主动脉 ET 免疫组化检测结果($\times 400$)



A 正常组 B 模型组 C 额尔敦—乌日勒 D 辛伐他汀组
图 2 各组家兔主动脉 PAF 免疫组化检测结果($\times 400$)

3 讨论

动脉粥样硬化的发生、发展与血管内皮功能密

切相关,内皮细胞具有抗凝、止血、选择性屏障、细胞通透性等作用,内皮细胞功能障碍可使血液中的脂质等成分堆积于内皮下间隙,从而形成泡沫细胞^[7]。血管内皮功能减退是动脉粥样硬化早期病变最敏感的指标,是 AS 的重要始动因素之一。内皮细胞损伤是诱发 AS 的重要环节,保护内皮细胞可有效防止 AS 的发生发展。ET 是内皮细胞分泌的主要缩血管因子,维持血管张力,调节血管内皮功能,而 PAF 是动脉粥样硬化形成的关键起始因子^[8]。

随着民族医药的发展,蒙医蒙药在临床上取得了良好疗效,并具有安全、高效、低毒等优势。AS 易损斑块的检测手段多具有损伤性,目前常采用复合因素造模建造雄性家兔 AS 易损斑块模型,实验 8 周末通过检测血脂,显示家兔已形成 AS 易损斑块,为进一步观察蒙药额尔敦—乌日勒对 AS 易损斑块血清及主动脉 ET、PAF 的干预作用奠定了基础。实验结果表明额尔敦—乌日勒能降低 AS 家兔血清及主动脉 ET、PAF 水平($P<0.01$),并且与辛伐他汀组相比,在影响 AS 易损斑块家兔主动脉 ET 水平上具有一定的优势($P<0.05$),为临床寻找他汀类药物的替代治疗提供了科学的实验依据,亦为临床运用中蒙药治疗 AS 提供更加完善的实验理论和依据。

总之,额尔敦—乌日勒可能通过降低血管内皮

因子 ET、PAF 的上升水平,降低主动脉组织 ET 的表达,恢复内皮功能的平衡状态,从而发挥稳定动脉粥样硬化易损斑块的作用。

参 考 文 献

- [1] 李丹,李玉洁,杨庆,等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):272-276.
- [2] 麻春杰,董平,都格尔,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—中医药现代化,2011,13(5):894-898.
- [3] 董平,麻春杰,温都苏,等. 额尔敦—乌日勒对实验性家兔动脉粥样硬化的影响[J]. 中华中医药学刊,2011,29(5):1012-1015.
- [4] 乌兰其其格,麻春杰,董平,等. 额尔敦—乌日勒对 AS 家兔血清 NO 含量及主动脉 eNOS 基因表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2015,33(3):603-605.
- [5] 董平. 珍宝丸抗动脉粥样硬化作用及其机制研究[D]. 呼和浩特:内蒙古医学院,2011.
- [6] 都格尔. 额尔敦—乌日勒及其优化方对动脉粥样硬化易损斑块家兔模型的干预作用[D]. 北京:北京中医药大学,2014.
- [7] 邱雅慧. 血管内皮细胞的功能以及损伤修复与动脉粥样硬化[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(10):1927-1929.
- [8] Tokumura A, Sumida T, Touda M, et al. Platelet-activating factor (PAF)-like oxidized phospholipids: relevance to atherosclerosis[J]. Biofactors,2000,13(1-4):29-33.

(收稿日期:2015-05-04)

(本文编辑:董历华)

(上接第 1432 页)

- [5] 国家中医药管理局. GB/T 16751.2-1997 中医临床诊疗术语 证候部分[S]. 北京:国家技术监督局,1997.
- [6] 国家中医药管理局. ZY/T001.4-94.3 中医病证诊断疗效标准[S]. 南京:南京大学出版社,1994.
- [7] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002.
- [8] 陈建平. 脑涨落图仪在老年性痴呆病人中的应用[J]. 中国老年学杂志,2009,29(8):2020-2023.
- [9] Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease[J]. Neurochem Int,2004,45(5):583-589.
- [10] 曾志芬,张国华,陈建平,等. 脑涨落图检测脑梗死患者神经递质功率变化的特点[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2009,13(13):2505-2509.
- [11] 陶永苍,贾磊华,臧贺川,等. 脑超慢涨落图技术检测急性脑梗死患者脑内神经递质变化特点研究[J]. 中国全科医学,2012,15(7):2424-2427.
- [12] 王哲,刘丽波,刘畅,等. 脑梗塞患者血及脑脊液中兴奋性氨基酸的改变及意义[J]. 中国实验诊断学,2002,6(6):369-371.
- [13] 金光亮,周东风,苏晶. 电针对慢性应激抑郁模型大鼠单胺类递质的影响[J]. 中华精神科杂志,1999,32(4):220-222.
- [14] Mizoguchi K, Shoji H, Ikeda R, et al. Persistent depressive state after chronic stress in rats is accompanied by HPA axis dysregulation and reduced prefrontal dopaminergic neurotransmission[J]. Pharmacol Biochem Behav,2008,91(1):170-175.
- [15] Rasheed N, Ahmad A, Pandey CP, et al. Differential response of central dopaminergic system in acute and chronic unpredictable stress models in rats[J]. Neurochem Res,2010,35(1):22-32.
- [16] Richard S. Snell. 临床神经解剖[M]. 王涛,主译. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2011:262,277-278.
- [17] 陈泽奇,金益强,陈国林,等. 肝气郁结证血浆去甲肾上腺素和肾上腺素测定结果分析[J]. 中医药学报,1997,(5):47.
- [18] 张成,赵志付. 心身疾病“刚柔辩证”四种常见证型焦虑抑郁状态的特征研究[J]. 世界中西医结合杂志,2015,10(2):198-200,239.

(收稿日期:2015-04-14)

(本文编辑:韩虹娟)