

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2008)16-04-0290-03

瓜蒌薤白半夏汤对兔动脉粥样硬化模型 主动脉蛋白聚糖的作用

王 剑, 黄水清, 徐志伟

(广州中医药大学基础医学院, 广东省广州市 510006)

[关键词] 药理学; 瓜蒌薤白半夏汤; 动脉粥样硬化模型; 主动脉; 硫酸软骨素蛋白聚糖; 硫酸皮肤素蛋白聚糖; 血脂

[摘要] 目的 从调整动脉壁蛋白聚糖代谢角度观察化痰治法代表方剂——瓜蒌薤白半夏汤抗动脉粥样硬化的药理机制。方法 3月龄新西兰兔30只,随机分为正常组、模型组、治疗组。模型组和治疗组均给予高脂饮食造成动脉粥样硬化模型,治疗组同时给予瓜蒌薤白半夏汤灌胃。6周后取材,检测血脂,观察主动脉粥样硬化病变程度,提取主动脉蛋白聚糖,酶解为糖胺多糖,再进行醋酸纤维素薄膜电泳分析,测定各种糖胺多糖组份含量。结果 正常组血胆固醇和低密度脂蛋白含量分别为 13.43 ± 3.12 mmol/L、 8.53 ± 1.37 mmol/L,动脉壁蛋白聚糖组份硫酸软骨素、硫酸皮肤素含量分别为 21.93 ± 1.82 mg/g、 15.56 ± 1.61 mg/g;与正常组比较,模型组表现为典型的动脉粥样硬化病理变化,血总胆固醇和低密度脂蛋白含量明显升高,分别为 23.63 ± 4.31 mmol/L、 15.63 ± 1.27 mmol/L ($P < 0.01$),动脉壁蛋白聚糖组份硫酸软骨素、硫酸皮肤素含量明显升高,分别为 31.23 ± 1.41 mg/g、 19.36 ± 1.64 mg/g ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与模型组比较,治疗组动脉粥样硬化灶病变程度明显减轻,动脉壁蛋白聚糖组份硫酸软骨素、硫酸皮肤素含量明显降低,分别为 22.33 ± 1.58 mg/g、 14.36 ± 1.71 mg/g ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),但血胆固醇和低密度脂蛋白无明显的降低,分别为 20.54 ± 3.59 mmol/L、 14.53 ± 1.32 mmol/L。结论 瓜蒌薤白半夏汤可降低粥样硬化病变动脉壁硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸皮肤素蛋白聚糖含量,从而减轻动脉粥样硬化病变,但降低血脂作用不明显。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effect of Gualou Xiebai Banxia Decocotion on Metablism of Proteoglycans in Aorta in Rabbits of Atherosclerosis Model

WANG Jian, HUANG Shui-Qing, and XU Zhi-Wei

(Basic Medical College of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

[KEY WORDS] Gualou Xiebai Banxia Decocotion; Atherosclerosis Model; Aorta; Chondroitin Proteoglycans; Dermatan Sulfate Proteoglycans; Blood fat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the anti-atherosclerosis mechanism of phlegm clearing treatment, Gualou Xiebai Banxia Decocotion (GXBD), a typical decoction of phlegm clearing treatment was studied in the effect of modulating the metablism of proteoglycans in aorta. **Methods** Thirty rabbits were randomly divided into three groups, normal group, model group, and treatment group. Model group and treatment group were fed with high lipid food to induce the pathological change of atherosclerosis, besides, treatment group was given with GXBD everyday, while normal group was fed with normal food as control. After six weeks, blood fat and aorta atherosclerosis pathological changes was examined, proteoglycans was extracted and turned to glycosaminoglycan by enzymolysis, electrophoretic analysis was used to determine the consist and content of every kinds of glycosaminoglycan. **Results** The atherosclerosis pathological changes was evident, in conrtol group, the contents of cholesterin and low density lipoprotein were 13.43 ± 3.12 mmol/L and 8.53 ± 1.37 mmol/L, the contents of chondroitin and dermatan sulfate were 21.93 ± 1.82 mg/g, 15.56 ± 1.61 mg/g; wheras in model group, cholesterin and low density lipoprotein increased to 23.63 ± 4.31 mmol/L, 15.63 ± 1.27 mmol/L ($P < 0.01$), chondroitin and dermatan sulfate increased to 31.23 ± 1.41 mg/g, 19.36 ± 1.64 mg/g ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); contrast to model group, the atherosclerosis pathological changes in treatment group were evidently impoved, the contents of chondroitin and dermatan sulfate decreased to 22.33 ± 1.58 mg/g, 14.36 ± 1.71 mg/g ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), the content of cholesterin, low density lipoprotein of blood shows little changes. **Conclusions** The gualou xiebai banxia decocotion exerts the anti-atherosclerosis effect by modulating the metablism of proteoglycans rather than modulating the blood fat.

[收稿日期] 2008-01-09

[修回日期] 2008-04-05

[作者简介] 王剑, 博士, 副研究员, 研究方向为化痰治法, 联系电话为 020-39358037, E-mail 为 zswj@gzhtcm.edu.cn。黄水清, 博士, 研究员, 研究方向为中医药防治动脉粥样硬化疾病, 联系电话为 020-39358463, E-mail 为 hsq@gzhtcm.edu.cn。徐志伟, 博士, 教授, 研究方向为中医病因与治法, 联系电话为 020-39358888, E-mail 为 xuzhiweiz@gzhtcm.edu.cn。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种特殊的慢性炎症过程,这种炎症过程源于血浆脂蛋白、各种细胞组分(单核/巨噬细胞、T 淋巴细胞、内皮细胞和平滑肌细胞)与动脉壁细胞外基质间的相互作用^[1,2]。在此过程的启动环节,由移入动脉内膜的平滑肌细胞和浸润的巨噬细胞等所产生的蛋白聚糖(proteoglycans, PG)代谢紊乱,其组份硫酸软骨素蛋白聚糖(chondroitin proteoglycans, CSPG)、硫酸皮肤素蛋白聚糖(dermatan sulfate proteoglycans, DSPG)等生成增多,积聚滞留在 As 灶局部,与低密度脂蛋白结合,促进低密度脂蛋白的沉积与氧化修饰成为氧化型低密度脂蛋白,促进氧化型低密度脂蛋白被吞噬细胞所吞噬,在 As 的发病机制中具有重要作用。

中医学认为 As 相关疾病属于痰瘀阻络所致,临床实践证明化痰治疗方法具有良好的疗效,但其具体的药理机制尚未研究清楚。本文在前期理论分析和工作基础上,从调整动脉壁 PG 代谢探索瓜蒌薤白半夏汤(化痰治法代表方剂)的药理机制。

1 材料与方剂

1.1 动物及分组

3 月龄新西兰兔 30 只,由广州中医药大学动物中心提供,合格证号:SCXK(粤)2003-0001,体重 1.5~2.0 kg,随机分为正常组、模型组和治疗组,每组 10 只,雌雄各半。正常组用普通饲料喂养。模型组喂饲 80% 的普通饲料+20% 高脂饲料(15% 蛋黄粉、0.5% 胆固醇和 5% 猪油),连续 6 周。治疗组的高脂饮食同模型组,同时每日灌胃瓜蒌薤白半夏汤浓缩液一次,共 6 周。

1.2 药物与试剂

瓜蒌薤白半夏汤组成:按全瓜蒌 30 g、薤白 15 g 和半夏 15 g 的组成比例,加 10 倍药材重量的水浸泡 1 h 后煎煮 40 min,取滤液,再加 8 倍药材重量的水煎煮 40 min,合并二次滤液,80℃水浴浓缩至每毫升含生药 2.0 g。以成人(70 kg)临床瓜蒌薤白半夏汤用量全瓜蒌 30 g、薤白 15 g 和半夏 15 g,按等效剂量的 5 倍换算成兔实验用剂量为 14 g/kg。

木瓜蛋白酶、胰蛋白酶、标准品硫酸软骨素(chondroitin sulfate, CS)均为 sigma 公司产品,4℃保存。电泳缓冲液:0.1 mol/L 醋酸铜(20.0 g CuAc₂, 100 mL 冰醋酸,900 mL 纯水, pH 3.1)。染色液:0.2% 阿利新蓝 8GX(w/v)溶于脱色液中,脱色液:含 10% (v/v) 乙醇、0.1% (v/v) 冰乙酸的 30 mmol/L 氯化镁溶液。

1.3 仪器

DYY-6C 型 双稳时电泳仪电源、DYCP-38B 型卧式水平电泳槽(北京六一厂)、分光光度计(721)、自动生物化学分析仪(OLYMPUS AU600)。

1.4 指标检测

6 周造模周期结束后,乙醚麻醉实验用兔,心脏取血,取出心脏至膈肌之间的主动脉,观察内膜 As 病变情况。血脂检测:以自动生物化学分析仪按人血脂检测方法检测血清总胆固醇(cholesterol total, TC)、血清甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)和高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)。PG 提取和测定参考文献[3]进行。简述如下,将主动脉称重,脱水、脱脂,取相同重量的各标本量用于后续实验。对各标本依次用稀碱和蛋白酶水解提取糖胺多糖,以醋酸铜为缓冲液,用醋酸纤维薄膜电泳法分析各标本中糖胺多糖的组份,经染色、洗脱,将各染色斑点剪下,溶于含 94 mmol/L 硫酸的二甲基亚砷中,于 677 nm 测定光吸收度。分别用 0.1 g/L、0.2 g/L、0.4 g/L 和 0.6 g/L 标准品 CS 在同等条件下进行醋酸纤维薄膜电泳、染色、洗脱、溶解,于 677 nm 检测吸光度。以标准曲线为依据计算出样本中各蛋白聚糖成分的含量。

1.5 统计学处理

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较以 SPSS 11.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 瓜蒌薤白半夏汤对动脉粥样硬化病理的影响

肉眼观察 As 斑块形成情况发现,正常组动脉内膜光滑,无斑块形成;模型组斑块非常明显,动脉内膜的表面几乎全为融合的斑块所覆盖,面积均较大;而治疗组病变明显减轻,斑块模型组显著减小。

2.2 瓜蒌薤白半夏汤对血脂的影响

与正常组比较,模型组 TC、LDL 明显升高($P < 0.01$),TG、HDL 无统计学差异;与模型组比较,治疗组 TC、LDL、TG、HDL 差异无显著性(表 1)。

2.3 瓜蒌薤白半夏汤对蛋白聚糖的影响

由主动脉组织所提取蛋白聚糖,酶解为糖胺多糖,以醋酸纤维素薄膜电泳分离出四条区带(图 1)。动脉组织含有四种糖胺多糖,分别为 CS、DS、HS 和 HA,按文献[3]方法在醋酸铜电泳缓冲液中,各糖胺多糖相对迁移率相对固定,从前端至后端分别是 CS、DS、HS、HA。

以标准曲线作为定量标准计算各组待测样本糖

胺多糖含量,实验结果表明,与正常组相比,模型组动脉壁CS、DS含量明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与模型组比较,治疗组动脉壁蛋白聚糖组份CS、DS含量明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

表1. 各组血脂比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, mmol/L)

分 组	TC	TG	LDL	HDL
正常组	13.43 ± 3.12	1.16 ± 0.31	8.53 ± 1.37	2.86 ± 1.02
模型组	23.63 ± 4.31 ^a	1.25 ± 0.57	15.63 ± 1.27 ^a	2.36 ± 1.21
治疗组	20.54 ± 3.59 ^a	1.29 ± 0.35	14.53 ± 1.32 ^a	2.47 ± 1.16

a为 $P < 0.01$,与正常组比较。

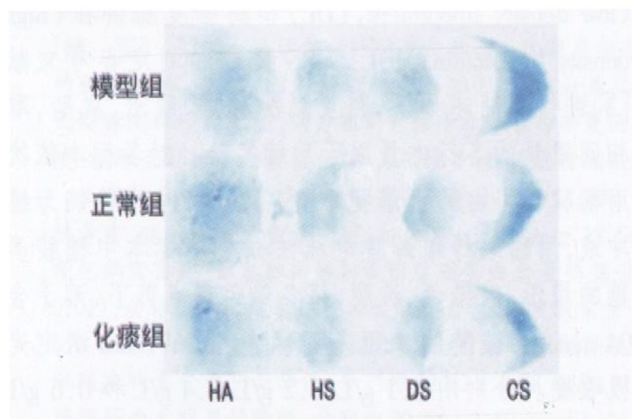


图1. 各组主动脉糖胺多糖电泳图

表2. 各组主动脉糖胺多糖组成比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, mg/g)

分 组	CS	DS	HS	HA
正常组	21.93 ± 1.82	15.56 ± 1.61	16.71 ± 1.57	50.23 ± 2.32
模型组	31.23 ± 1.41 ^a	19.36 ± 1.64 ^b	15.63 ± 1.27	52.63 ± 2.57
治疗组	22.33 ± 1.58 ^c	14.36 ± 1.71 ^c	14.53 ± 1.32	49.73 ± 2.16

a为 $P < 0.01$, b为 $P < 0.05$,与正常组比较; c为 $P < 0.01$,与模型组比较。mg/g的含义是每g脱水脱脂的动脉组织中含有糖胺多糖的mg数。

3 讨论

蛋白聚糖是细胞间质的一种重要成分,由糖胺多糖和蛋白组成,糖胺多糖是功能的特征部分,依据糖胺多糖的不同而分为各种蛋白聚糖组份。动脉壁蛋白聚糖主要有硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸皮肤素蛋白聚糖、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、透明质酸。目前研究发现,动脉壁硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸皮肤素蛋白聚糖具有促进As病理进程的作用。与正常冠状动脉比较,在病变动脉的脂质聚集区内有较多硫酸软骨素蛋白聚糖分布,部分泡沫细胞胞浆内有硫酸软骨素蛋白聚糖存在,提示硫酸软骨素蛋白聚糖的聚集与细胞内、外脂质沉积密切相关。进一步研

究发现在As病变部位,硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸皮肤素蛋白聚糖其糖胺多糖分子链变长,硫酸化程度增高,带负电荷的蛋白聚糖部分与低密度脂蛋白带正电荷的载脂蛋白-B部分有高度的亲和性,促使低密度脂蛋白在动脉壁内沉积和聚集,对As斑的形成起到了促进作用,这一病理环节被认为是As发病早期的关键和启动环节^[4,5]。考虑到蛋白聚糖与LDL沉积聚集和氧化修饰的重要关系,目前国外已有项目研究旨在降低LDL与蛋白聚糖亲和性的药物,以预防和逆转As的发生发展^[6,7],但仍处于实验室研发阶段,未有临床研究报道。

本文前期研究发现蛋白聚糖组份的代谢紊乱与中医学痰证病理变化之间存在着一定联系^[8]。在本次实验中,观察化痰方剂——瓜蒌薤白半夏汤对As模型兔主动脉蛋白聚糖代谢的作用,实验结果表明,As模型组新西兰兔血脂升高,As病理改变明显,动脉壁蛋白聚糖中硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸皮肤素蛋白聚糖增多;同期给予瓜蒌薤白半夏汤能明显减轻As灶病变程度,明显降低动脉壁蛋白聚糖中硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸皮肤素蛋白聚糖含量,但对血脂无明显的降低作用。这一作用提示瓜蒌薤白半夏汤可通过调整动脉壁蛋白聚糖代谢而达到减轻As病变,而调节血脂代谢作用不明显。此外,化痰方药能否调节蛋白聚糖中糖胺多糖分子链的长度及硫酸化程度,从而影响蛋白聚糖与脂蛋白的亲合力,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 王燕,杨永宗. 炎症反应在动脉粥样硬化发病学中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(7): 706-708.
- [2] 范乐明. 动脉粥样硬化炎症机制的再认识[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(3): 249-253.
- [3] 李玉瑞. 细胞外间质的生物化学及研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 199-203.
- [4] Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S. Early Human Atherosclerosis. Accumulation of Lipid and Proteoglycans in Intimal Thickenings Followed by Macrophage Infiltration [J]. *ATVB*, 2007, 27(5): 1159-1165.
- [5] Khalil MF, Wagner WD, Goldberg IJ. Molecular interactions leading to lipoprotein retention and the initiation of atherosclerosis [J]. *ATVB*, 2004, 24(12): 2211-2218.
- [6] Little PJ, Ballinger ML, Osman N. Vascular wall. Proteoglycan synthesis and structure as a target for the prevention of atherosclerosis [J]. *WHRM*, 2007, 3(1): 117-124.
- [7] Kunihisa Kobayashi, Toyoshi Inoguchi, Noriyuki Sonoda, et al. Adiponectin inhibits the binding of low-density lipoprotein to biglycan, a vascular proteoglycan [J]. *BBRC*, 2005, 335(1): 66-70.
- [8] 王剑,徐志伟,严灿. 从粘液类物质代谢异常探讨痰证机理[J]. 上海中医药杂志, 2005, 19(5): 42-43.

(此文编辑 李小玲)