

松龄血脉康对大鼠脑动脉粥样硬化血管内皮功能的影响及其脑保护机制

岳 丽, 高钟生

(张家口市第一医院神经内二科, 河北省张家口市 075000)

[关键词] 脑动脉粥样硬化; 高血压; 高血脂; 松龄血脉康; 内皮功能; Notch 通路

[摘要] **目的** 探究松龄血脉康对大鼠脑动脉粥样硬化(CAS)血管内皮功能的影响和脑保护机制。**方法** 将SD大鼠分为对照组、CAS组和松龄血脉康组。CAS组和松龄血脉康组大鼠建立高血压和高血脂诱导的CAS模型,松龄血脉康组大鼠以松龄血脉康灌胃干预。比较各组大鼠血压和血脂指标。苏木精-伊红染色(HE)检测基底动脉和脑组织病理形态学变化。酶联免疫吸附法检测血清一氧化氮(NO)和内皮素1(ET-1)水平。Western blot检测Notch1和Hes1蛋白表达水平。**结果** CAS组大鼠血压和血脂水平均显著高于对照组($P<0.05$),松龄血脉康组血压和血脂水平显著低于CAS组($P<0.05$)。对照组基底动脉形态学正常,CAS组血管内膜出现损伤,动脉中膜平滑肌细胞排列紊乱,松龄血脉康组的病理形态介于对照组和CAS组之间。CAS组NO水平显著低于对照组而ET-1显著高于对照组($P<0.05$),松龄血脉康组NO水平显著高于CAS组而ET-1显著低于CAS组($P<0.05$)。对照组大鼠脑组织结构完整,细胞正常,核仁明显,胞质丰富;CAS组大鼠脑组织细胞排列异常,核仁不明显,细胞质出现空晕;松龄血脉康组形态和排列基本正常。CAS组Notch1和Hes1水平显著高于对照组($P<0.05$),松龄血脉康组Notch1和Hes1水平显著低于CAS组($P<0.05$)。**结论** 松龄血脉康具有保护高血压和高血脂引起的血管内皮细胞和拮抗脑损伤的作用,这种作用可能与抑制Notch通路有关。

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

Effects of Songling Xuemaikang on vascular endothelial function in rats with cerebral atherosclerosis and its protective mechanism

YUE Li, GAO Zhongsheng

(Department of the Second Neurology, the First Hospital of Zhangjiakou, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

[KEY WORDS] cerebral atherosclerosis; hypertension; hyperlipidemia; Songling Xuemaikang; endothelial function; Notch pathway

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Songling Xuemaikang (SX) on vascular endothelial function and its protective mechanism in rats with cerebral atherosclerosis (CAS). **Methods** SD rats were divided into 3 groups: control group, CAS group and the SX group. CAS model of hypertension and hyperlipidemia was established in the CAS group and the SX group. Rats in the SX group were treated by Songling Xuemaikang. The blood pressure and blood lipid indexes of each group of rats were detected and compared. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes of basilar artery and brain tissue. Serum levels of nitric oxide (NO) and endothelin-1 (ET-1) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. The expression levels of Notch1 and Hes1 protein were detected by Western blot. **Results** The blood pressure and blood lipid levels of the CAS group were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$). The blood pressure and blood lipid levels of the SX group were significantly lower than those of the CAS group ($P<0.05$). The basilar artery morphology of the control group was normal. In the CAS group, the intima of the rat was damaged, the lipid was deposited in the intima of the artery, and the smooth muscle cells in the middle layer of the artery were disordered. The pathological morphology of the SX group was between the control group and the CAS group. The NO of the CAS group was significantly lower than that of the control group and the ET-1 was sig-

[收稿日期] 2019-11-14

[修回日期] 2019-12-11

[基金项目] 河北省中医药管理局科研计划(2017334)

[作者简介] 岳丽,主治医师,研究方向为神经内科相关疾病,E-mail 为 yking725@163.com。

nificantly higher than the control group ($P < 0.05$). The NO of the SX group was significantly higher than that of the CAS group and the ET-1 was significantly lower than the CAS group ($P < 0.05$). In the control group, the brain tissue structure was completed, the cells were normal, the nucleolus was obvious, and the cytoplasm was abundant. In the CAS group, the brain cells of the rats were arranged one time, the nucleoli were not obvious, and the cytoplasm showed empty halos. The morphology and arrangement of the SX group were basically normal, and the nucleolus and cytoplasm were clear. The levels of Notch1 and Hes1 in the CAS group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$). The levels of Notch1 and Hes1 in the SX group were significantly lower than those in the CAS group ($P < 0.05$).

Conclusion Songling Xuemaikang has the effect of protecting vascular endothelial cells caused by hypertension and hyperlipidemia and antagonizing brain damage, which may be related to the inhibition of Notch pathway.

脑动脉粥样硬化(cerebral atherosclerosis, CAS)是引起多种脑血管疾病的病理基础,CAS的发生与年龄、高血压和高血脂相关,这些影响因素引起动脉内皮细胞功能异常,导致血管壁增厚、弹性下降并出现动脉斑块,形成脑动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)^[1]。中医将高血脂归类于气血津液病变,类似“痰浊”、“瘀血”^[2]。而将高血压归类于“头痛”、“眩晕”等范畴,风、火、痰、瘀、虚等长期在体内转化为“火”或“热”,扰乱肝阳,或阳亢耗阴引起肝阳上亢^[3]。研究显示,Notch 信号通路具有促进炎症反应、调节血脂、影响细胞增殖等作用,在 As 发生发展中发挥重要作用^[4]。松龄血脉康胶囊主要成分为鲜松叶、葛根、珍珠层粉等,具有平肝潜阳、活血化瘀之功效,在高血压、高血脂相关疾病的治疗中具有较好的效果。最新研究显示其在 As 中也有较好的效果,但是关于其对 CAS 的作用尚不清楚^[5-6]。因此本文建立 CAS 大鼠模型,分析松龄血脉康对 CAS 大鼠基底动脉血管内皮细胞功能和脑组织的影响,并分析其对 Notch 信号通路的作用,以探究松龄血脉康治疗 CAS 的效果和机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和仪器

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠(清洁级, 240 ~ 280 g, 南京医科大学动物实验中心)。松龄血脉康胶囊(北京嘉林药业股份有限公司, 批号 161036)。大鼠饲料(新乡医学院实验动物中心)。胆固醇、胆酸(北京奥博星生物)。丙硫氧嘧啶(上海如吉生物)。小动物生理信号采集与处理仪器(8SP, Powerlab 公司, 澳大利亚)。全自动生化分析仪(AU2700, 贝克曼公司, 美国)。苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒(碧云天公司)。酶联免疫吸附试剂盒(喜宝生物科技有限公司)。Notch1 和 Hes1 抗体(Abcam 公司, 美国)。PVDF 膜

(Bio-Rad 公司, 美国)。ARCHITECT i2000SR 酶标仪(雅培公司, 美国)。ABI 7500 PCR 检测系统(Life Technology 公司, 美国)。倒置显微镜(Olympus IX71, Tokyo, 日本)。

1.2 建模及分组

将 30 只大鼠随机均分为 3 组, 即对照组、CAS 组和松龄血脉康组, 各 10 只。其中 CAS 组和松龄血脉康组按照参考文献^[7]建立高血压、高血脂诱导的 CAS 模型。首先通过双侧肾动脉狭窄建立高血压模型, 将大鼠腹腔注射异戊巴比妥麻醉后固定于手术台, 暴露并分离出双侧肾动脉, 使用 2-0 手术缝合线做活结, 将 0.25 mm 毫针平行放置于肾动脉上, 扎紧手术线, 然后轻轻抽去毫针, 将肾动脉放入腹腔, 常规缝合、消毒; 术后 1 周后喂养高脂饲料, 高脂饲料构成成为胆固醇(质量比 1%)、胆酸(质量比 0.5%)、猪油(质量比 10%)、蛋黄(质量比 10%)以及丙硫氧嘧啶(质量比 0.1%), 其余为普通饲料。对照组大鼠仅暴露双侧肾动脉不结扎, 然后喂养常规饲料。共喂养 15 周。松龄血脉康组大鼠使用松龄血脉康灌胃(胶囊内容物溶于无菌水中), 剂量为 20 mg/kg, 每日 1 次, 连续 4 周^[8]。对照组大鼠等量生理盐水灌胃。然后检测血压和血脂, 采集尾静脉血液样本, 大鼠麻醉后处死, 收集脑基底动脉组织样本。

1.3 血压和血脂测定

15 周后通过小动物生理信号采集与处理仪器检测血压, 通过全自动生化分析仪检测各组大鼠血脂指标, 包括总胆固醇(total cholesterol, TC)、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)。

1.4 HE 染色检测脑基底动脉和脑组织病理形态学变化

将脑基底动脉样本以及脑组织样本分别固定、包埋后切为 4 μm 厚均匀薄片, 经过脱蜡、水合处理

后,根据试剂盒方法依次加入苏木精、曙红等试剂,室温下温育约 2 min。显微镜下观察病理形态学变化。

1.5 酶联免疫吸附法检测血清一氧化氮和内皮素 1 水平

将血液样本室温静置 30 min,离心 10 min (3 000 r/min),通过 ELISA 检测上层血清中一氧化氮(nitric oxide,NO)和内皮素 1(endothelin-1,ET-1)水平,按照试剂盒说明书操作。

1.6 Western blot 检测 Notch1 和 Hes1 蛋白表达水平

将基底动脉组织清洗后裂解、离心,收集总蛋白并检测蛋白浓度。使用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,PVDF 膜转膜,室温下 5% 无脂牛奶封闭 2 h。分别加入相应的一抗(稀释 1:1 000)室温震荡 2 h,4 ℃ 孵育过夜,加入二抗(稀释 1:5 000),孵育 3 h。通过 Quantity One 软件分析条带灰度值,并计算 Notch1 和 Hes1 蛋白表达量。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用方差分析,不同组间比较采用 LSD 多重比较分析, $P < 0.05$ 为差异有统

计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠血压比较

CAS 组和松龄血脉康组收缩压和舒张压均显著高于对照组($P < 0.05$),松龄血脉康组血压显著低于 CAS 组($P < 0.05$;表 1)。

表 1. 各组大鼠血压比较(mmHg)

Table 1. Comparison of blood pressure between rats in each group(mmHg)

分组	<i>n</i>	收缩压	舒张压
对照组	10	107.47±6.85	78.14±5.05
CAS 组	10	159.47±10.54 ^a	124.87±8.24 ^a
松龄血脉康组	10	145.58±11.74 ^{ab}	115.04±10.57 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 CAS 组比较。

2.2 各组大鼠血脂指标比较

CAS 组 TC、TG 和 LDL 均显著高于对照组($P < 0.05$),松龄血脉康组的 TC、TG 和 LDL 显著低于 CAS 组($P < 0.05$;表 2)。

表 2. 各组大鼠血脂指标的比较(mmol/L)

Table 2. Comparison of blood lipids in rats of each group (mmol/L)

分组	<i>n</i>	TC	TG	LDL	HDL
对照组	10	2.15±0.41	0.66±0.14	0.24±0.05	0.79±0.13
CAS 组	10	4.21±0.67 ^a	1.19±0.32 ^a	1.57±0.28 ^a	0.75±0.18
松龄血脉康组	10	3.24±0.61 ^b	0.82±0.28 ^b	0.67±0.25 ^b	0.80±0.21

a 为 $P < 0.05$,与对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与 CAS 组比较。

2.3 各组大鼠基底动脉形态学变化

对照组动脉细胞排列正常,管壁厚度均匀。CAS 组血管内膜出现损伤,并且可以观察到脂质在

动脉内膜沉积,动脉中膜平滑肌细胞排列紊乱。松龄血脉康组血管病理形态介于对照组和 CAS 组之间(图 1)。

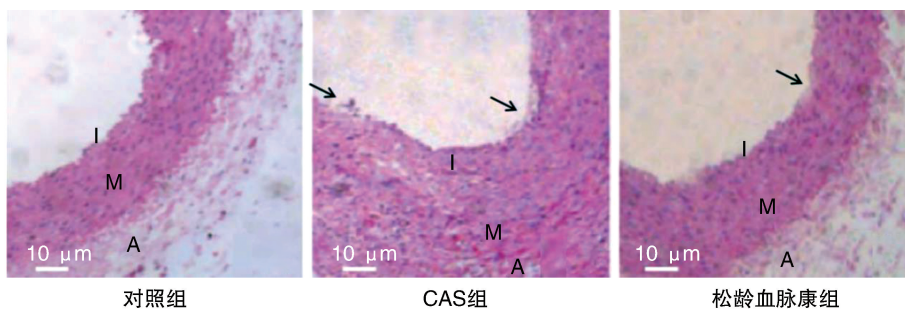


图 1. HE 染色检测各组大鼠基底动脉形态学变化

I 为动脉内膜,M 为动脉中膜,A 为动脉外膜。箭头所指处血管内皮细胞脱落,管壁内有泡沫细胞形成并有脂质沉积。

Figure 1. HE staining for detection of basilar artery morphology in each group

2.4 各组大鼠血清 NO 和 ET-1 水平比较

CAS 组和松龄血脉康组 NO 显著低于对照组, ET-1 显著高于对照组 ($P<0.05$); 松龄血脉康组 NO 显著高于 CAS 组, ET-1 显著低于 CAS 组 ($P<0.05$; 表 3)。

表 3. 各组大鼠 NO 和 ET-1 水平比较

Table 3. Comparison of NO and ET-1 levels in each group

分组	n	NO ($\mu\text{mol/L}$)	ET-1 ($\mu\text{g/L}$)
对照组	10	82.05 \pm 10.48	48.15 \pm 15.67
CAS 组	10	50.48 \pm 9.54 ^a	93.24 \pm 22.81 ^a
松龄血脉康组	10	69.26 \pm 12.67 ^{ab}	65.18 \pm 18.97 ^{ab}

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 CAS 组比较。

2.5 各组大鼠脑组织形态学变化

对照组大鼠脑组织结构完成, 细胞正常, 核仁明显, 胞质丰富。CAS 组大鼠脑组织细胞排列异常, 核仁收缩, 细胞质染色出现空白。松龄血脉康组大鼠脑组织形态和排列基本正常, 核仁和胞质基本清晰 (图 2)。

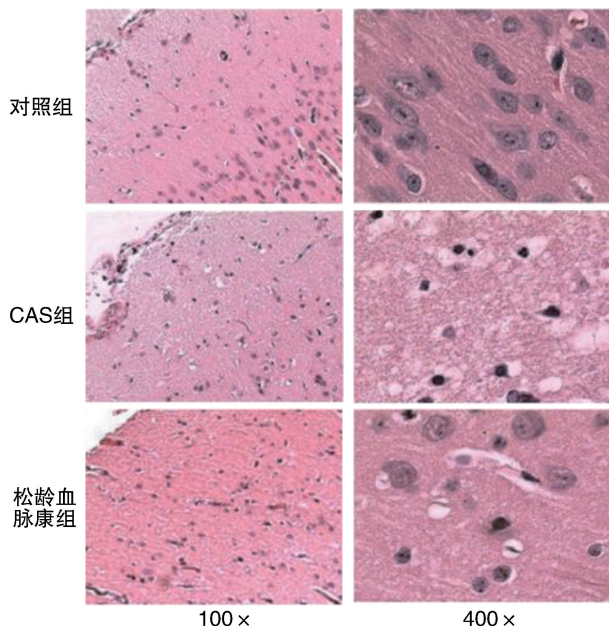


图 2. HE 染色检测各组大鼠脑组织形态学变化

Figure 2. HE staining for detection of brain histomorphology in each group

2.6 各组基底动脉组织 Notch 通路信号分子变化比较

CAS 组和松龄血脉康组基底动脉组织 Notch1 和 Hes1 蛋白表达水平显著高于对照组 ($P<0.05$), 松龄血脉康组的 Notch1 和 Hes1 蛋白表达水平显著低于 CAS 组 ($P<0.05$; 图 3 和表 4)。

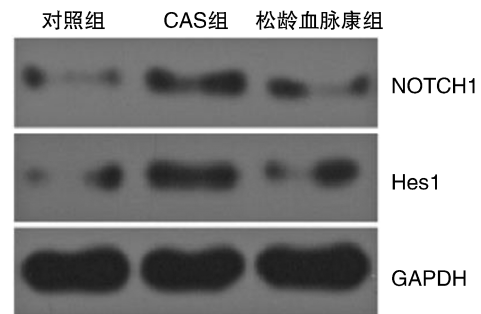


图 3. 各组大鼠基底动脉 Notch1 和 Hes1 蛋白水平的比较

Figure 3. Comparison of the levels of Notch1 and Hes1 proteins in the basilar artery of each group

表 4. 各组大鼠 Notch1 和 Hes1 蛋白表达水平比较

Table 4. Comparison of the levels of Notch1 and Hes1 proteins in the basilar artery of each group

分组	n	Notch1	Hes1
对照组	10	1.25 \pm 0.08	2.18 \pm 0.18
CAS 组	10	3.52 \pm 0.36 ^a	4.68 \pm 0.51 ^a
松龄血脉康组	10	2.48 \pm 0.46 ^{ab}	3.57 \pm 0.39 ^{ab}

a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 CAS 组比较。

3 讨论

随着中国人口老龄化加剧和人们生活方式的改变, 高血压和高血脂发病率逐渐升高, 由此诱发的 CAS 发病率也呈现上升趋势。CAS 是多种脑血管疾病的发病机理, 包括脑梗死、脑缺血等, 严重威胁患者健康和生命安全。中医中药在治疗 CAS 中取得了重要的进展, 高血压和高血脂在中医中分别被认为是“肝阳上亢”以及“气血津液病变”。在松龄血脉康配伍中, 松针为君药, 主“苦降温通”、“平肝潜阳”; 葛根具有“升举清阳”之功效, 为臣药, 具有增强君药的“平肝潜阳”的作用。珍珠粉为佐为使, 具有“平肝熄风”的作用, 各成份互相调和, 共同作用, 发挥“平肝减阳”、“化浊调脂”的功效, 并对高血压和高血脂具有治疗作用^[8]。

高血压和高血脂是引起 CAS 的重要原因, 过高血压引起的强剪切力会损伤血管内皮细胞并诱导氧化应激反应和血管内皮细胞释放炎症因子^[9], 使血液中的脂质更易沉积在受损内皮处形成粥样斑块, 并引起动脉内皮细胞功能受损和中层平滑肌细胞功能异常^[10]。NO 和 ET-1 是调节血管舒张和收缩功能并反映内皮细胞功能的重要因子, 两者为功能强大的血管扩张剂和血管收缩活性物质, 其动态平衡在调节血管功能中发挥着重要的作用, 其水平的变化参与脑供血和脑损伤的进程^[11-12]。本研究为分析松龄血脉康对 CAS 大鼠内皮功能和脑损伤

的影响,通过双侧肾动脉狭窄术建立了大鼠高血压模型,并且通过高脂饮食提高血脂水平,结果显示 CAS 组大鼠收缩压、舒张压、TC、TG 和 LDL 均显著高于对照组,并且收缩压均高于 135 mmHg,提示高血压高血脂大鼠模型建立成功。而松龄血脉康组血压、TC、TG 和 LDLC 显著低于 CAS 组,说明松龄血脉康可有效调节血脂降低血压。本研究 HE 染色检测了脑基底动脉的形态学变化,结果显示 CAS 组血管内膜出现损伤,并且可以观察到脂质在动脉内膜沉积,中层平滑肌细胞排列紊乱。松龄血脉康组的病理形态介于对照组和 CAS 组之间。这说明 CAS 大鼠模型建立成功,并且松龄血脉康可有效减少粥样斑块的形成,抑制动脉中膜细胞异常增殖。CAS 组 NO 显著低于对照组而 ET-1 显著高于对照组,松龄血脉康组 NO 显著高于 CAS 组而 ET-1 显著低于 CAS 组。郑艳等^[13]研究结果显示松龄血脉康胶囊可通过调节 NO 和 ET-1 水平而保护内皮细胞,减少高血压对内皮功能的影响。张莲莲等^[14]研究也显示松龄血脉康会调节血压和血脂,使 NO 上调并抑制 ET-1 水平,改善内皮细胞功能并抑制粥样斑块的发生。此外,也有研究显示松龄血脉康可以抑制神经细胞凋亡保护神经功能^[15]。这提示松龄血脉康可能通过发挥“平肝潜阳”、“活血化瘀”的功能调节血压和血脂,并且通过改善炎症反应和调节氧化应激减少动脉粥样斑块的形成,并保护内皮功能。

CAS 不但会影响脑供血,其炎症反应和氧化应激失衡会引起脑组织的损伤,本研究结果也显示 CAS 组大鼠脑组织细胞排列异常,核仁不明显,细胞质出现空晕。松龄血脉康组形态和排列基本正常,核仁和胞质基本清晰。为进一步分析松龄血脉康对内皮功能和脑组织保护作用的分子机制,本文检测了其 Notch 通路的影响。Notch 通路的激活会引起炎症反应,并诱导巨噬细胞的炎症细胞至内皮损伤处,加速粥样斑块的形成^[16]。有临床研究显示 Notch1 水平与动脉钙化程度密切相关^[17]。此外,Notch 的水平也会影响颅脑损伤后的脑神经功能^[18]。本研究结果显示 CAS 组 Notch1 和 Hes1 蛋白表达水平显著高于对照组,松龄血脉康组的 Notch1 和 Hes1 蛋白表达水平显著低于 CAS 组。这提示松龄血脉康可能通过抑制 Notch 通路抑制炎症因子释放减少粥样斑块的形成,并发挥脑保护作用。

综上所述,松龄血脉康具有治疗高血压和高血脂所致 CAS 的作用,并发挥保护内皮细胞功能和脑损伤的作用,这种作用可能与抑制 Notch 通路的表达有关。但是关于 Notch 对于 CAS 患者脑保护作用仍需要进一步的临床观察,关于松龄血脉康治疗

CAS 的机制仍需要进一步研究。

参考文献

- [1] Kim BJ, Lee KM, Lee SH, et al. Ethnic differences in intracranial artery tortuosity: a possible reason for different locations of cerebral atherosclerosis[J]. J Stroke, 2018, 20(1): 140-141.
- [2] 刘婷,肖华. 芪参归龙饮联合西药对慢性心力衰竭合并高脂血症老年患者血清心肌钙蛋白与骨桥蛋白的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 8(8): 1108-1110.
- [3] 张洋,何建成,黄品贤,等. 原发性高血压中医证素分布及其与影响因素的相关性研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 12(12): 5664-5668.
- [4] 阮中宝,傅行礼,李伟,等. 靶向沉默 Notch 1、2 和 3 基因对动脉粥样硬化患者巨噬细胞 Notch 和核因子 κ B 信号通路的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2016, 44(9): 786-792.
- [5] Jiang Y, Guo H, Liu Y, et al. Songling xuemaikang capsules for patients with low-to-medium risk hypertension: study protocol for a randomized controlled trial[J]. Trials, 2019, 20(1): 218-220.
- [6] 王新广,张志敏,杜国峰,等. 松龄血脉康联合瑞舒伐他汀治疗 H 型高血压颈动脉粥样硬化疗效观察[J]. 中国心血管病研究, 2014, 12(10): 884-887.
- [7] 朱岩岩,李彤,李合华,等. 高血压合并高血脂建立脑动脉硬化大鼠模型的实验研究[J]. 中华脑科疾病与康复杂志(电子版), 2014, 4(2): 31-34.
- [8] Yang XC, Xiong XJ, Yang GY, et al. Songling Xuemaikang capsule for primary hypertension: a systematic review of randomized controlled trials[J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(4): 312-320.
- [9] Liu A, Yu Z, Wang N, et al. Carotid atherosclerosis is associated with hypertension in a hospital-based retrospective cohort[J]. Int J Clin Exp Med, 2016, 8(11): 21932-21938.
- [10] Zhao Y, Yang Y, Xing R, et al. Hyperlipidemia induces typical atherosclerosis development in LDLR and ApoE deficient rats[J]. Atherosclerosis, 2018, 271(1): 26-35.
- [11] Derkacz A, Szymczyszyn A, Szahidewiczkrupska E, et al. Effect of endovascular coronary low-level laser therapy during angioplasty on the release of endothelin-1 and nitric oxide[J]. Adv Clin Exp Med, 2017, 26(4): 595-599.
- [12] Fuji S, Matsushita S, Hyodo K, et al. Association between endothelial function and micro-vascular remodeling measured by synchrotron radiation pulmonary micro-angiography in pulmonary arterial hypertension[J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2016, 64(10): 1-7.
- [13] 郑艳,林莘,郑平,等. 松龄血脉康胶囊联合杞菊地黄丸对肝肾亏虚兼血瘀证老年高血压患者血管内皮功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 1(18): 164-168.
- [14] 张莲莲,刘健彤,韩再刚. 松龄血脉康胶囊治疗冠心病合并高脂血症疗效观察[J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 8(8): 882-883.
- [15] Yang H, Zhang R, Jia C, et al. Neuronal protective effect of Songling Xuemaikang capsules alone and in combination with carbamazepine on epilepsy in kainic acid-kindled rats[J]. Pharm Biol, 2019, 57(1): 22-28.
- [16] 蔡宏文,朱敏,周鑫斌,等. 重组人内皮抑素通过激活 Dll4/Notch 通路抑制大鼠动脉粥样硬化斑块内血管新生[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(9): 1700-1703.
- [17] 李韶南. 女性冠心病患者雌激素、Notch1 水平与冠状动脉钙化严重程度的关系[J]. 中国心血管病研究, 2019, 17(1): 124-126.
- [18] 隋立森,余佳彬,姜晓丹. 大鼠创伤性颅脑损伤后脑室下区 Notch1 蛋白表达的时程变化研究[J]. 中华神经医学杂志, 2016, 15(8): 778-782.

(此文编辑 朱雯霞)