

调脂柔脉颗粒治疗高脂血症大鼠的实验研究^{*}

刘莎¹ 朱晓娜^{2**} 杨志宏² 任鑫睿¹ 王昕¹

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712000; 2. 陕西中医药大学附属医院, 陕西 咸阳 712000)

摘要: **目的** 探讨调脂柔脉颗粒对高脂血症大鼠血脂以及颈部血管形态学的影响。 **方法** 将 72 只 SPF 大鼠随机分为空白组(普通饲料喂养)、模型组、调脂柔脉低、中、高剂量组以及西药辛伐他汀组(高脂饲料喂养), 造模 8 W 建立高脂血症大鼠模型, 给予相应药物灌胃治疗。灌胃结束后取大鼠血清以及颈部血管, 用全自动生化分析仪检测甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C), 用 HE 染色方法观察颈部血管病理组织变化情况。 **结果** 调脂柔脉低、中、高组以及辛伐他汀组在 TC、TG、LDL-C 上显著低于模型组($P < 0.05$), HDL-C 高于模型组($P > 0.05$); 颈部血管 HE 染色结果显示: 调脂柔脉各剂量组以及辛伐他汀组在颈部血管的光滑度、厚度、平滑肌排列整齐度上与模型组比较病变情况均有不同程度改善。 **结论** 调脂柔脉颗粒可以通过调节大鼠脂质代谢过程, 改善颈部斑块情况, 从而发挥抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)作用。

关键词: 调脂柔脉颗粒; 高脂血症; 动脉粥样硬化; 实验研究; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 2096-1340(2022)02-0067-05

DOI: 10.13424/j.cnki.jsctcm.2022.02.015

Experimental Study on Tiaozhi Roumai Granule in Treatment of Hyperlipidemia Rats

LIU Sha¹ ZHU Xiaona² YANG Zhihong² REN Xinrui¹ WANG Xin¹

(1. Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China;

2. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Traditional Chinese Medicine, Shaanxi Xianyang 712000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Tiaozhi Roumai granule on blood lipid and neck vascular morphology in hyperlipidemia rats. **Methods** 72 SPF Rats were randomly divided into blank group (fed with ordinary diet), model group, low, medium and high dose groups of Tiaozhi Roumai and Western medicine simvastatin group (fed with high-fat diet). The hyperlipidemia rat model was established after 8 weeks, and the corresponding drugs were given by gavage. After gavage, the serum and neck blood vessels of rats were taken. Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) were detected by automatic biochemical analyzer. The pathological changes of neck blood vessels were observed by HE staining. **Results** TC, TG and LDL-C in Tiaozhi Roumai low, medium and high groups and simvastatin group were significantly lower than those in model group ($P < 0.05$), and HDL-C was higher than those in model group ($P > 0.05$); The results of HE staining of cervical blood vessels showed that the smoothness, thickness and smooth muscle arrangement of cervical blood vessels in each dose group and simvastatin group were improved in varying degrees compared with the model group. **Conclusion** Tiaozhi Roumai granule can improve the condition of cervical plaque by regulating the process of lipid metabolism in rats, so as to play the role of anti atherosclerosis (AS).

Key words: Tiaozhi Roumai granule; Hyperlipidemia; Atherosclerosis; Experimental research; Rat

^{*} 基金项目: 咸阳市科技局项目(2018K02-87)

^{**} 通讯作者: 朱晓娜, 副主任医师。E-mail: 15591023903@163.com

脑卒中是影响我国居民健康的常见疾病,现每年于40~74岁之间的发病率以8.3%的幅度增长,且增长幅度已经由2012年—2018年从1.89%上升到2.32%,增长了0.43%,同时缺血性以及出血性脑卒中3月内的复发率分别为6.8%、0.7%。在2018年的人口普查数据中我国大约有194万人死于此病,伤残率中缺血性、出血性卒中的达到1007/10万、1192/10万。脑卒中的高初发率、复发率、致残率以及死亡率,使对卒中的研究越来越多。动脉粥样硬化是引发卒中的基础,血脂异常是引起动脉硬化的重要因素,据中国慢病与危险因素监测的数据显示,高胆固醇、高三酰甘油、高低密度脂蛋白以及低高密度脂蛋白发生率为:6.9%、13.8%、20.4%和8.1%,且在性别上有明显的不同。因此在治疗脑卒中的过程中治疗高脂血症以及动脉粥样硬化是很关键的^[1]。陕西省名中医杨志宏自拟调脂柔脉颗粒在临床治疗高脂血症以及其引起的动脉硬化方面有明显的效果,因此,本文建立高脂血症大鼠模型,探讨其作用机制,为临床提供作用依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 购买健康SPF级雄性大鼠72只,8周龄,平均体重在 (220 ± 10) g之间,购于西安交通大学医学部实验动物中心,生产许可证:SCXK(陕)2019-021。动物饲养于陕西中医药大学药学院动物实验室,实验室室内温度维持在 $20^{\circ}\text{C} \sim 27^{\circ}\text{C}$,室内湿度保持在48%~70%,室内光照时间 $9 \sim 10 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。该实验得到陕西中医药大学第一附属医院动物实验伦理审查委员会批准(批准号:SUCMDL20210420001)。

1.2 药品和试剂 调脂柔脉颗粒:购买于陕西中医药大学附属医院门诊中药房,本品为纯中药组成袋装药品,每袋药量为10 g。辛伐他汀钙片:购买于陕西中医药大学附属医院门诊西药房,厂家:山东方明药业集团股份有限公司,规格:10 mg × 10片/盒,国药准字:H20063146。

试剂:甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);0.9%氯化钠、水合氯醛、乙醇、苏木素、二甲苯、中性树脂、玻片(均由西安恩斯维尔生物科技

有限公司提供);蒸馏水(陕西中西药大学实验室提供)。

1.3 仪器 JJ200 电子精密天平(江苏常熟/双杰);SIM-F140BDL 制冰机(日本/SANYO);TDL-50C 低速离心机(上海安亭/飞鸽);601051 微量离心管(江苏/耐思);HARRIS -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱(深圳/生泰科技有限公司);WT84MDF 低温冰箱(日本/三洋);EXCELSIOR AS 全自动组织脱水机(江苏维林科生物技术有限公司);HISTOCENTR 包埋机(上海聚慕医疗器械有限公司);LEICA 切片机(常州市飞勒斯仪器有限公司);LEICA 研究级正置显微镜(上海/成贯仪器有限公司-显微系统部);TBA-120FR 全自动生化分析仪(日本/东芝)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组与造模 72只大鼠给予适应性饲养一周后采取随机法,将其分为6组,每组12只大鼠,6组大鼠分别为:空白组、模型组、低剂量调脂柔脉颗粒组、中剂量调脂柔脉颗粒组、高剂量调脂柔脉颗粒组、辛伐他汀组。将所有大鼠给予适应性喂养一周,同时给予正常饮水、饮食。适应性喂养结束后,空白组大鼠继续给予普通饲料喂养,模型组、调脂柔脉颗粒各组以及西药组均给予高脂饲料喂养(高脂饲料配方:基础饲料69.5%+蔗糖10%+蛋黄粉10%+胆固醇0.5%+猪油10%),同时每组均给予蒸馏水自由饮用,喂养周期均为12 w。本次动物实验通过陕西中医药大学附属医院伦理委员会批准。

1.4.2 药物干预 大鼠给药剂量根据人和动物之间体表面积折算的等效剂量比值0.018进行计算,灌胃容量以1 mL/100 g进行计算。中剂量组的调脂柔脉颗粒为成人的等效剂量。低、中、高剂量组的比例分别以1/2:1:2。西药组给药剂量为 $0.9 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 。6组大鼠在饲养8周后造模结束,并进行造模结果是否成功的检测。8周后空白组以及模型组给予生理盐水灌胃,低、中、高调脂柔脉组以及西药组均给予对应药物灌胃治疗,每天于上午固定时间灌胃1次,连续灌胃4 w,每周对大鼠体重进行测量,并根据变化做出相应的药物剂量调整。

1.4.3 取材 在喂养8 w结束后,每组大鼠禁食不禁水12 h以后,每组随机取6只老鼠进行眼眶

静脉丛取血,检测大鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)水平,如表 1 结果所示:证实高脂血症动物模型造模成功。大鼠于 12 w 后禁食不禁水 12 h,大鼠以 10% 水合氯醛以 0.3 mL/100 g 的剂量麻醉后,仰卧位固定于解剖台上,于腹主动脉处采取大鼠血液于抗凝管中,同时分离出大鼠颈部血管,并放置于多聚甲醛中。24 h 后对颈部血管组织进行包埋,行 3 μM 切片,随后予以二甲苯脱蜡,分别经过不同浓度乙醇洗后置于蒸馏水中,再予以苏木素染色 5 min,自来水冲洗,盐酸乙醇再次进行分化 30 s,自来水冲洗,置伊红染液 2 min,常规脱水,透明,封片,待镜下观察。

1.5 统计学方法 统计学分析运用 SPSS 21.0 进行分析,计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析 (ONE-WAY ANOVA), $P < 0.05$ 时数据差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠造模成功 TC、TG 检测表 经统计学分析后,与空白组比较,其余 5 组在 TC、TG 上均显著提高($P < 0.05$),与模型组比较,调脂柔脉低、中、高以及辛伐他汀组未见明显差异($P > 0.05$),表明

高脂血症造模成功,见表 1。

表 1 各组大鼠造模情况血脂检测表
(mmol · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	TC	TG
空白组	1.45 ± 0.43	1.07 ± 0.43
模型组	4.23 ± 0.16 [#]	2.40 ± 0.25 [#]
调低组	3.49 ± 1.82 ^{#*}	2.55 ± 0.50 ^{#*}
调中组	3.37 ± 1.07 ^{#*}	2.72 ± 0.86 ^{#*}
调高组	2.89 ± 0.46 ^{#*}	2.68 ± 0.47 ^{#*}
辛伐组	3.02 ± 1.09 ^{#*}	2.68 ± 0.19 ^{#*}

注:与空白组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较^{*} $P > 0.05$

2.2 调脂柔脉颗粒对大鼠血清 TC、TG、LDL-C、HDL-C 含量比较 模型组 TC、TG、LDL-C 显著高于空白组($P < 0.05$),HDL-C 显著低于空白组,调脂柔脉颗粒低、中、高组以及辛伐他汀组在 TC、TG、LDL-C 上显著低于模型组($P < 0.05$),其结果有统计学意义,HDL-C 高于空白组($P > 0.05$),但比较无统计学意义,见表 2。

表 2 各组大鼠血脂变化表 (mmol · L⁻¹, $\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	TC	TG	LDL-C	HDL-C
空白组	1.57 ± 0.64	1.16 ± 0.43	0.41 ± 0.29	1.23 ± 0.44
模型组	3.79 ± 1.72 [#]	2.66 ± 0.49 [#]	1.17 ± 0.51 [#]	0.91 ± 0.43 [▲]
调低组	2.43 ± 1.28 [*]	1.91 ± 0.44 [*]	0.72 ± 0.48 [*]	1.68 ± 0.81 [*]
调中组	2.06 ± 0.91 [*]	1.61 ± 0.54 [*]	0.48 ± 0.25 [*]	2.17 ± 0.90 [*]
调高组	1.68 ± 0.45 [*]	1.47 ± 0.47 [*]	0.59 ± 0.30 [*]	1.48 ± 0.54 [*]
辛伐组	1.91 ± 0.55 [*]	1.66 ± 0.61 [*]	0.52 ± 0.28 [*]	1.52 ± 0.35 [*]

注:与空白对照组比较,[#] $P < 0.05$;与模型组比较,^{*} $P < 0.05$;与模型组比较,[▲] $P > 0.05$;与模型组比较,^{*} $P > 0.05$

2.3 调脂柔脉颗粒对大鼠颈部血管病理形态学的影响 空白组:其内膜是光滑的,管腔厚度是均匀一致的,平滑肌细胞排列较为整齐,见图 1。模型组:观察到组织内膜受损,管腔厚度明显不规则

增厚,平滑肌细胞排列不规则,见图 2。调脂柔脉颗粒各剂量组以及辛伐他汀组均可见内膜较模型组光滑,且管腔厚度较模型组变薄且厚度较均匀,以中、高剂量组较为明显,见图 3、4、5、6。

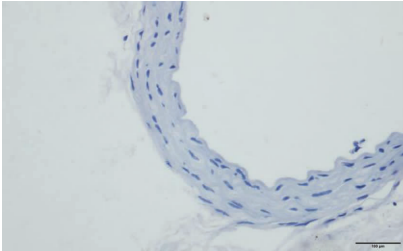


图 1 空白组(40 倍)

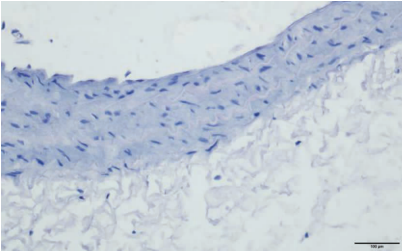


图 2 模型组(40 倍)

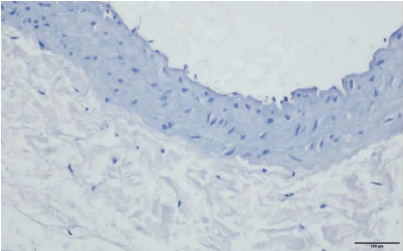


图 3 调脂柔脉低剂量组(40 倍)

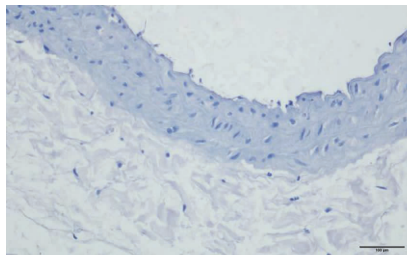


图 4 调脂柔脉中剂量组(40 倍)

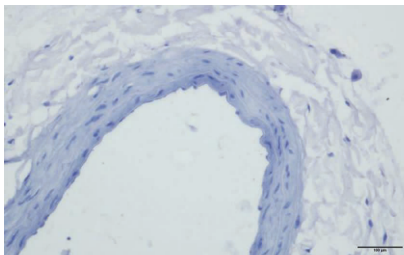


图 5 调脂柔脉高剂量组(40 倍)

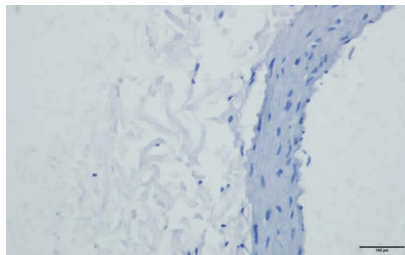


图 6 辛伐他汀组(40 倍)

3 讨论

动脉粥样硬化 (ATHEROSCLEROSIS, AS) 是一种累积全身大、中动脉血管的炎症反应疾病,在病情初期主要是脂质和复合糖类积聚、继而出血和血栓形成;进展期的主要反应为钙质沉着及纤维组织增生,同时伴有中层血管的蜕变和钙化,最终导致动脉管壁变硬变脆、管腔狭窄,导致供血部位的缺血、缺氧。高脂血症是形成 AS 的高危因素,研究表明,高脂血症作用于血管内皮细胞,造成其损伤,刺激内膜下 LDL-C 被氧化,形成可以被巨噬细胞吞噬的 OX-LDL,产生大量的泡沫细胞,促进 AS 的形成^[2-3]。

调脂柔脉颗粒(天花粉、黄芪、葛根、制首乌、决明子、丹参、大黄、苍术、山楂、槐角)是杨志宏主任医师根据“肝脾肾-气瘀痰”的病位以及病理因素自拟的方药,具有健脾益肾、燥湿化痰、活血化瘀、降脂化浊的功效。在前期的动物实验中表明^[4-5],其可使大鼠总胆固醇、甘油三酯、全血低切、高切黏度降低;抑制大鼠动脉壁 ICAM-1 基因的表达。在临床实验研究中发现^[6-8],调脂柔脉颗粒可以减慢脑血流动力学中的 PI(血管搏动指数)、RI(血管阻力指数),提高 MCA(大脑中动脉)及 VA(椎动脉)的 VS(收缩期血流速度),调节血脂代谢程度,缩小颈动脉斑块面积,促进神经功能恢复。且现代研究表明:其组方中的葛根可减少巨噬细胞凋亡^[9];黄芪甲苷可降低炎症因子氨基末端激酶、肿瘤坏死因子- α 、核转录因子 KB mRNA^[10];决明子的活性成分影响外源性以及内源性脂质的吸收、合成、代谢,调节胆固醇在体内的分布水平^[11];山楂叶总黄酮可以通过干预血脂、血糖、抗氧化、减轻炎症反应、减少细胞损伤^[12];丹参素可以降低血清中的 IL-6 和 CRP,参与炎症反应、影响与调节性 T 细胞有关的 CD4⁺、CD25⁺、FOXP3⁺ 等细胞,影响免疫系统的调节、抑制 TLR-

NF- κ B 通路中的 TLR2 和 TLR4、P-I κ B 和 NF- κ B P65 蛋白表达^[13];大黄素抑制脂肪酸转运蛋白 (FATP1),影响脂肪酸的合成代谢、抑制周脂素,使脂肪分解速率降低、增加促进三酰甘油水解的脂肪三酰甘油脂肪酶、抑制 11BETA-HSD1 的活性而影响脂肪代谢^[14];其组方中的多种药物被现代研究证明可以通过各种途径抑制高脂血症,进而发挥抗 AS 的作用。

他汀类可以通过影响过氧化物酶体增殖活化受体 (PPAR),促进脂肪分解,促进褐色脂肪细胞 (BAT) 分化,减少白色脂肪组织含量,使抑炎因子分泌增多,促炎因子分泌减少,增加胰岛素敏感性,干预炎症应答与糖脂代谢;可以影响肝脏低密度脂蛋白受体 (LDLR),促进对糖脂代谢有积极作用的 BAT 的活化;使心外膜脂肪组织 (EAT) 沉积减少,及其介导的脂毒性物质以及促炎因子减少;增加 AS 保护性脂肪因子 (APN、APELIN 基因、VASPIN 基因) 与致病性脂肪因子 (瘦素、内脂素、抵抗素) 表达,发挥抗 AS 的作用^[15]。因此,本实验选取辛伐他汀作为调脂柔脉治疗对照组,观察调脂柔脉颗粒对高脂血症大鼠的作用。

TC、TG、LDL-C、HDL-C 水平是反应高脂血症以及动脉硬化的重要指标^[16],当 TG 水平升高时,会引起机体内的 HDL 含量降低,sLDL 升高,继发炎症反应,内皮的受损^[17],研究发现,TG 水平的升高还与胰腺炎之间有密切关系,当 TG > 5.65 mmol · L⁻¹ 时,应该进行降脂治疗,有益于胰腺炎患者病情的进展与预后^[18]。TG 水平的升高会引起机体损伤,控制 TG 在适当水平是临床治疗的关键。TC 作为环戊烷多氢菲的衍生物,TC 升高会引起血管壁损害,同时在各种介质作用下,引起脂质堆积^[19]。LDL-C 是构成人体内固醇类激素、胆酸、细胞膜的主要物质,经临床实验发现,LDL-C 控制到 30 mg · dL⁻¹ 水平时,是临床上较好的控制其引发其他疾病如:

冠状动脉粥样硬化性心脏病的血脂水平^[20]。HDL 是一种运载胆固醇的介质,其通过胆固醇逆向转运机制干预胆固醇流出、酯化和转化为胆汁酸三种过程,从而调节机体内的脂质平衡,同时,HDL-C 水平与冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑动脉粥样硬化以及老年性黄斑变性等多种疾病之间有密切的关系^[21]。因此,本实验选用 TC、TG、LDL-C、HDL-C 作为调脂柔脉颗粒疗效检测指标。

通过最终实验研究我们可以发现,调脂柔脉颗粒可以通过调节血脂代谢,降低 TC、TG、LDL-C,升高 HDL-C,改善大鼠血管结构,减轻斑块形成,在治疗效果上可以跟他汀类的作用比拟。调脂柔脉颗粒治疗高脂血症有一定的实验支持,但本实验仍存在很多的不足,在证明调脂柔脉颗粒进一步治疗 AS 上仍需要更多的研究。

参考文献

[1] Report on stroke prevention and treatment in China Writing Group.《中国脑卒中防治报告 2019》概要[J]. 中国脑血管病杂志,2020,17(5):272-281.

[2] 谢翔. 动脉粥样硬化患者甘油三酯升高的管理中国专家共识[J]. 中华全科医学,2019,17(5):709-713.

[3] 鲁森. 动脉粥样硬化的血流动力学机理研究与脂质传输特性分析[D]. 济南:山东大学,2020:11.

[4] 杨志宏,许红,杨耀峰. 调脂柔脉颗粒对实验性高脂血症模型大鼠血脂、血流变的影响[J]. 西部中医药,2016,29(9):12-14.

[5] 杨志宏,李经渭,袁有才,等. 调脂柔脉颗粒对高脂血症大鼠动脉壁 ICAM-1 基因表达的影响[J]. 陕西中医,2016,37(5):630-631.

[6] 袁有才,宋轩,曹旻,等. 调脂柔脉颗粒对症状性颈动脉粥样硬化血脂及颈内膜作用的临床研究[J]. 现代中医药,2018,38(5):17-20.

[7] 朱晓娜,李天浩,郭珍,等. 调脂柔脉颗粒治疗脑动脉硬化症 72 例[J]. 陕西中医药大学学报,2019,42(6):113-116.

[8] 朱晓娜,李天浩. 调脂柔脉颗粒治疗动脉粥样硬化性脑梗死的疗效评价[J]. 西部中医药,2012,25(10):77-78.

[9] 王翘遥,高严格,张晓东,等. 葛根素延缓动脉粥样硬化进展的机制研究[J]. 现代生物医学进展,2020,20(16):3022-3027.

[10] 裴可,张倩,杜孜玮,等. 黄芪甲苷对动脉粥样硬化炎症反应及周细胞生物学功能的影响[J]. 中华中医药杂志,2020,35(5):2501-2506.

[11] 杨冰,任娟,秦昆明,等. 决明子药理作用及其机制研究进展[J]. 中药材,2018,41(5):1247-1251.

[12] 于悦卿,张明明,赵培,等. 山楂叶总黄酮对 APOE 基因敲除小鼠血浆炎症、凋亡和应激相关蛋白的影响及意义[J]. 河北医药,2019,41(18):2762-2765.

[13] 曾妮,许妹萍,庄丽明. 丹参素对大鼠动脉粥样硬化的作用及其机制[J]. 免疫学杂志,2020,36(10):884-889,896.

[14] 郝洁,梁艳,张瑞,等. 大黄素改善糖脂代谢异常、糖尿病周围神经病变及糖尿病肾病的作用机制研究进展[J]. 中药药理与临床,2020,36(3):265-272.

[15] 张娜,邹静怡,高燕. 他汀类药物调节 ASCVD 脂肪代谢机制的研究进展[J]. 解放军医药杂志,2020,32(5):113-116.

[16] 陈炎,陈亚蓓,陶荣芳.《2016 年中国成人血脂异常防治指南》内容介绍[J]. 中国实用内科杂志,2017,37(1):38-42.

[17] 马依彤. 动脉粥样硬化患者甘油三酯升高的管理中国专家共识要点与解读[J]. 中国循环杂志,2019,34(1):66-68.

[18] 蒋鑫,严永峰,钟瑞,等. 血清甘油三酯水平对急性胆源性胰腺炎预后的影响[J]. 临床肝胆病杂志,2020,36(11):2509-2514.

[19] 郭明秋,殷晓捷,刁殿琰,等. 脂质代谢水平与冠状动脉粥样硬化病变的关系[J]. 中国动脉硬化杂志,2021,29(2):149-155.

[20] 何璐,王曦. 降脂治疗中 LDL-C 水平目标值的探讨[J]. 心血管康复医学杂志,2021,30(1):95-98.

[21] 周黎,李俊宜,何平平,等. 高密度脂蛋白结构、代谢和功能研究新进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2020,28(10):911-916.

(收稿日期:2021-02-19 编辑:崔春利)