

# 首乌丹参滴丸对实验性动脉粥样硬化家兔 ET/NO 及 NOS 的影响\*

李广斌, 华声瑜

**摘要:** [目的] 探讨首乌丹参滴丸(SWDS)对实验性动脉粥样硬化(AS)家兔血内皮素(ET)、血浆一氧化氮(NO)水平和一氧化氮合酶(NOS)的影响,并探讨其对动脉粥样硬化的治疗作用。[方法] 取50只健康雄性日本大耳白家兔,随机取10只作为正常对照组,喂普通饲料,其余40只给予高脂饮食,喂养4周后,再随机分为4组,每组10只。模型组继续喂高脂饲料;小剂量治疗组喂以高脂饲料和首乌丹参滴丸生药,每只1.25g/(kg·d);大剂量治疗组每只5g/(kg·d);阳性药物对照组喂以高脂饲料和辛伐他汀,每只2.35mg/(kg·d)。4周后,测定血脂、血清NO和血浆ET水平及血管壁组织NOS的含量。[结果] 小剂量、大剂量治疗组及阳性药物对照组的血浆内皮素-1(ET-1)水平明显较模型组低( $P<0.05$ ),血清NO水平及血管壁NOS的表达呈相反变化( $P<0.05$ )。[结论] 首乌丹参滴丸可降低血脂和血浆ET-1水平,提高血清NO及动脉壁组织NOS的表达,具有抗动脉粥样硬化作用。

**关键词:** 动脉硬化;内皮素;一氧化氮;一氧化氮合酶

中图分类号: R222.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-7145(2006)01-0029-03

Influence of Shouwu Danshen Dropping Pills on ET/NO and NOS in Rabbits with Experimental Atherosclerosis  
LI Guang-bin, HUA Sheng-yu

(Tianjin University of TCM, Tianjin 300193, China)

**Abstract:** [Objective] To explore the influence of ShouwuDanshen (fleeceflower stem and root of red-rooted salvia) dropping pills (SWDS) on the level of endothelin (ET), nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in rabbits with atherosclerosis and to investigate the therapeutic effect of SWDS on atherosclerosis. [Methods] Fifty healthy male Japanese white rabbits were used in the experiment. Ten rabbits were randomly selected as normal control group and were fed with normal forage. Forty rabbits were fed with hypercholesterd forage for four weeks and then were randomly divided into four groups: model group, small dosage group, large dosage group and control group. The rabbits of model group were only fed with hypercholesterd diet. The rabbits of small dosage group were treated with SWDS 1.25 g/(kg·d) and hypercholesterd diet. The rabbits of large dosage group were treated with SWDS 5 g/(kg·d) and hypercholesterd diet. The rabbits of positive control group were treated with simvastatin 2.35 mg/(kg·d) and hypercholesterd diet. After four weeks the levels of blood lipid, serum NO, plasma ET and NOS content in blood vessel tissue were measured. [Results] The level of plasma ET-1 in small dosage group, large dosage group and control group was significantly less than that in model group ( $P<0.01$ ). The expression of serum NO and NOS in blood vessel tissue showed opposite change ( $P<0.05$ ). [Conclusion] The SWDS dropping pills possesses an anti-atherosclerosis effect by decreasing the level of plasma lipids and ET-1 and increasing the expression of serum NO and NOS in blood vessel tissue. Key words: atherosclerosis; endothelin; nitric oxide; nitric oxide synthase

\* 基金项目: 天津市自然科学基金(003607911)。

作者单位: 300193 天津中医学院

作者简介: 李广斌(1975-), 男, 2004级硕士研究生, 从事心血管病临床研究工作。

动脉粥样硬化(AS)是严重威胁人类健康的疾病之一,中药在治疗AS及改善其临床症状中已显示一定的优越性,现代药理研究结果表明,丹参、何首乌均具有抗氧化、抑制过氧化脂质生成和清除自由基的作用。本实验借助AS家兔模型,观察研究首乌丹参滴丸对实验性高脂血症导致AS的防治作用。

## 1 材料与方

1.1 动物及饲料 纯系日本大耳白家兔,雄性,50只,体质量(2.19±0.17)kg,单笼饲养,自由饮水。高脂饲料由天津市武清区科达养殖中心提供。

1.2 实验药品 首乌丹参滴丸浸膏,为黑褐色浸膏,出膏率为15.26%,每克浸膏含6.55g生药,天士力集团提供,批号20020318。实验前用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液配成高剂量5g/mL和低剂量1.25g/mL的混悬液,供家兔灌胃用。阳性对照药为辛伐他汀片,用0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液配成1mg/mL混悬液,供家兔灌胃使用。

1.3 实验试剂及仪器 内皮素-1(ET-1)放免试剂盒购自北京北免东雅生物技术研究;一氧化氮(NO)试剂盒由购自南京建成生物工程研究所,一氧化氮合酶(NOS)试剂由武汉博士德公司提供。752C型紫外可见分光光度计(上海市第三分析仪器厂),高速冷冻离心机(sigma3K-30),OLYMPUSBX51显微摄影系统、IMAGINEPRO图像分析软件。SN-6110型加探头放射免疫计数器(上海核所日环光电仪器有限公司)。

## 1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及给药 50只家兔饲养1周以后,普测血脂和体质量,筛选出血脂及体质量符合规定者,将其分为正常对照组(10只,在以后灌胃中死亡1只)和高脂造型组(40只)。正常对照组家兔仅饲以普通饲料,高脂造型组家兔每天每只给予100g高脂饲料,喂养4周,待其全部吃完后再饲以普通饲料。每笼1只动物,日进食量约为150g,自由饮水。将经高脂饲料喂养4周的40只日本大耳白兔随机分为4组:1)模型组10只,继续喂高脂饲料;2)小剂量治疗组10只,喂高脂饲料加低剂量首乌丹参滴丸悬液;3)大剂量治疗组10只,喂高脂饲料加高剂量首乌丹参滴丸悬液;4)阳性药物对照组10只,喂高脂饲料和辛伐他汀,连续4周。所有药物均按1mL/kg体质量配制成混悬液,并按所述剂量开始给各组家兔灌胃给药,灌服1次/d,连续4周。

1.4.2 取材 添加治疗药物4周后,禁食8h,20%乌拉坦20mL/kg腹腔注射,在麻醉状态下去胸腹部被毛,沿腹正中线切开,在主动脉弓处取血管组织长1cm,先用生理盐水冲洗,后予10%的甲醛中固定2~4h。常规石蜡包埋,切片。

## 1.4.3 测定指标及方法

1)血脂的测定:取耳缘静脉血2mL,高速冷冻离心机离心,分离血清,全自动生化分析仪测甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)。

2)血清NO的测定:腹主动脉取血2mL,分离血清,采用硝酸还原酶法,步骤严格按照说明书操作进行。

3)血浆ET-1放射免疫法测定:将2mL静脉血置于含7.5%依地酸二钠(EDTA<sub>2</sub>Na)30μL和抑肽酶40μL的试管中,混匀4min,以3000r/min离心10min,分离血浆。置-20℃超低温冰箱保存,标本收齐后按ET试剂盒操作说明进行检测。

4)血管组织样品NOS含量的测定:兔主动脉弓石蜡切片经脱蜡和水化后,热修复抗原,冷却后磷酸盐缓冲溶液(PBS)洗涤2次,滴加5%BSA封闭液,室温。滴加1:100稀释的兔抗NOS的多克隆抗体,过夜。滴加生物素化羊抗兔IgG 20min。滴加试剂SABC室温20min。PBS洗涤5min 4次。DAB显色10min。然后用苏木精轻度复染。常规脱水,透明,封固。采用图像分析软件进行NOS蛋白表达的半定量分析。随机选取5个高倍视野,共计数500个细胞,计算胞核阳性的细胞数占细胞总数的百分比<sup>[4]</sup>。

1.4.3 统计结果 采用SPSS10.0软件分析,主要统计指标进行正态性检验,正态分布的各个统计指标以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。组间对比分析采用配对t检验,两样本均数比较采用t检验及SNK检验。

## 2 结果

2.1 首乌丹参滴丸对AS家兔血脂的影响 模型组、小剂量治疗组、大剂量治疗组、阳性药物对照组较正常对照组血清TC及TG均升高( $P < 0.01$ ),其中小剂量治疗组、大剂量治疗组、阳性药物对照组血清TC及TG的水平较模型组明显降低( $P < 0.05$ ),见表1。

2.2 首乌丹参滴丸对AS家兔血清NO、血浆ET-1的影响 小剂量治疗组、大剂量治疗组、阳性药物对照组治疗后,家兔的血浆ET-1水平明显低于模型组( $P < 0.01$ ),较正常对照组升高;与模型组相比较治疗后的血清NO含量升高( $P < 0.05$ ),见表2。

表1 首乌丹参滴丸对血清TC及TG的影响( $\bar{x} \pm s$ ) mmol/L

组别	n	TC	TG
正常对照组	9	1.13 ± 0.40	0.98 ± 0.26
模型对照组	10	25.53 ± 6.52	6.12 ± 0.53
低剂量组	10	18.32 ± 3.25	2.96 ± 0.26
高剂量组	10	15.15 ± 5.26	2.01 ± 0.35
辛伐他汀组	10	16.28 ± 3.66	2.21 ± 0.75

注:与正常对照组比较 P<0.01;与模型对照组对比 P<0.05。

表2 首乌丹参滴丸对AS家兔血清NO及血浆ET-1的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	ET-1 (ng/L)
正常对照组	9	56.98 ± 8.12	21.56 ± 2.09
模型对照组	10	9.12 ± 0.85	52.56 ± 8.56
低剂量组	10	26.32 ± 5.26	45.98 ± 2.56
高剂量组	10	39.56 ± 4.35	40.23 ± 5.56
辛伐他汀组	10	43.56 ± 6.57	38.25 ± 4.58

注:与正常对照组相比较, P<0.01;与模型组相比, P<0.05, P<0.01。

2.3 首乌丹参滴丸对AS家兔血管组织NOS表达的影响 正常家兔血管组织NOS呈现强表达状态;模型组NOS表达较正常对照组明显降低(P<0.01),小剂量治疗组、大剂量治疗组、阳性药物对照组NOS表达均有所提高,与模型组相比(P<0.01)。见表3。

表3 首乌丹参滴丸对AS家兔血管组织NOS表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	NOS阳性表达率(%)
正常对照组	9	57.52 ± 5.25
模型对照组	10	15.98 ± 5.32
低剂量组	10	28.12 ± 3.26
高剂量组	10	35.12 ± 5.56
辛伐他汀组	10	27.36 ± 8.78

注:与正常对照组比较, P<0.01;与模型组比较, P<0.01。

### 3 讨论

在高胆固醇血症中,自由基生成增多,导致氧化低密度脂蛋白( $\alpha\text{-LDL}$ )增多,与内皮细胞的 $\alpha\text{-LDL}$ 受体LOX-1结合而抑制NO的天然前体——L-精氨酸(L-Arg)的运转而抑制NO的合成,同时促进ET-1的表达,这可能是一条重要的 $\alpha\text{-LDL}$ 损伤内皮侵入内膜致AS的途径<sup>[2]</sup>。NOS是NO产生过程中的限速酶。内皮细胞中存在原生型NOS,作用于NO前体物质L-Arg,生成最强的内源性硝基舒血管物质NO。内皮来源的NO对维持血管基础张力有重要作用,并通过抗血小板黏附、聚集,抗内皮细胞表

达黏附分子,并通过依赖环磷酸鸟苷(cGMP)的途径抑制血管平滑肌细胞增殖,以及反馈抑制ET-1的合成和释放,清除自由基等机制而发挥抗动脉粥样硬化的作用<sup>[3]</sup>。内皮源性的NO还可抑制单核细胞的黏附和趋化作用,阻止单核细胞进入内皮下,防止AS的发生。

研究发现,模型组血清NO水平显著降低,血浆ET-1水平比正常组显著升高,提示AS家兔ET/NO的平衡失调,内皮功能紊乱;而首乌丹参滴丸小剂量、大剂量治疗组血清NO水平与模型组比显著升高,而小剂量、大剂量治疗组血浆ET-1水平却显著下降。说明首乌丹参滴丸对AS发展过程中ET/NO的平衡失调有调节作用。同时还发现,首乌丹参滴丸还能上调NOS的表达水平,推测首乌丹参滴丸通过调节脂质代谢,减少过氧化脂质的生成,减少NO的降解和合成抑制,并通过抑制ET-1合成、释放以及释放后的作用等机制,从而达到保护内皮功能而表现为抗AS作用<sup>[4-6]</sup>。

在传统中医理论指导下,结合大量临床实践,提出了以“滋补肾阴、活血化瘀”为大法的中药复方“首乌丹参滴丸”治疗AS,方中何首乌,性温,补益精血,具有滋肾养肝的功效。《本草求真》云:“首乌苦涩微温,阴不甚滞,阳不甚燥,得天地中和之气……为阴中之阳药。”女贞子味甘,具有滋补肝肾之功。何首乌配女贞子则能滋肾养肝,培补亏损之阴精,延缓衰老的进程,以治其本。丹参、三七有活血化瘀之功,故用以为臣。同时佐以辛凉开窍之冰片,其性走窜,可使药达病所。全方消补兼施,标本兼顾,药性平和,功效确切。

#### 参考文献:

- [1] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991.402.
- [2] 王淑华. 脂质过氧化物、抗氧化酶与动脉粥样硬化发生发展和消退关系的研究[J]. 中华病理学杂志,1992,21(1):238.
- [3] 周文. 内皮细胞脂质过氧化损伤与动脉粥样硬化[J]. 中华心血管杂志,1990,18(4):248.
- [4] 陈媛. 脂质过氧化作用与动脉粥样硬化[J]. 生物化学与生物物理进展,1989,16(4):278.
- [5] 王钟林. 血脂与心血管病的流行病学研究[J]. 实用老年医学,1998,12(5):200.
- [6] 黄从刚,魏劲波. 自由基及其清除剂对动脉粥样硬化的影响[J]. 医学综述,1998,4(4):166.

(收稿日期 2005-12-06)