

· 实验研究 ·

“营卫通络方”对动脉粥样硬化早期管壁微血管新生的作用

尹玉洁^{1,2,3}, 马柳一^{1,2,3}, 贾振华^{1,2,3}, 张军芳², 王宏涛², 单星阁², 刘 焕²
 (1 河北医科大学, 石家庄 050017; 2 河北以岭医药研究院, 石家庄 050035;
 3 河北医科大学附属以岭医院, 石家庄 050091)

[摘要] 目的: 观察“营卫通络方”对兔动脉粥样硬化早期管壁微血管新生的影响。方法: 将家兔随机分为正常组、模型组、桂芍通络高剂量组、桂芍通络低剂量组、阿托伐他汀组、通心络组。正常组给予普通饲料, 模型组及各用药组实施高脂饮食复合右侧颈动脉硅胶管包裹术。灌胃(*ig*)给药, *qd*连续至4周时取材, 检测各组血脂水平及颈动脉病理形态学、VEGF、VEGFR-2 蛋白表达、微血管血流量变化。结果: 与模型组相比, 各用药组可不同程度减轻血脂水平、术侧颈动脉管壁微血管新生程度($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: “营卫通络”方能够通过减少颈动脉管壁微血管血流量、血管内皮生长因子及其受体的表达, 从而抑制动脉粥样硬化早期管壁微血管新生。

[关键词] 动脉粥样硬化; 营卫通络; 滋养血管新生; 彩色微球; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R364.3; R543.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2016)11-1281-05

Effect of “Ying-Wei-Tong-Luo prescription” on the vasa vasorum angiogenesis in early atherosclerosis

YIN Yu-jie^{1,2,3}, MA Liu-yi^{1,2,3}, JIA Zhen-hua^{1,2,3}, ZHANG Jun-fang²,
 WANG Hong-tao², SHAN Xing-ge², LIU Huan²

(1 Hebei Medical University Shijiazhuang 050017, China; 2 Department of Cardiology, Yiling Medical Institute of Hebei Province Shijiazhuang 050035, China; 3 Yiling Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050091, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of “Ying-Wei-Tong-Luo prescription” on the vasa vasorum angiogenesis in early atherosclerosis. **Methods:** Rabbits were randomly divided into 6 groups. They were fed with high-fat diet in combination with carotid artery cannula to induce early atherosclerosis, and intragastrically treated with Gui-Shao-Tong-Luo (at two doses), atrovastatin and Tong-Xin-Luo, once a day for 4 weeks. Color microsphere method was used to detect the blood flow volume in the carotid artery microvasculature. The expression of VEGF and VEGFR-2 in the carotid artery adventitia was detected by Western blot. **Results:** After the treatments, the changes in vasa vasorum angiogenesis, the microvascular blood flow volume of the carotid artery, and VEGF and VEGFR-2 protein levels were attenuated in varying degrees compared with no treatment group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** “Ying-Wei-Tong-Luo prescription” can inhibit adventitial neovascularization in the early stage of atherosclerosis by reducing blood flow volume, and the expression of VEGF and VEGFR-2 in the carotid artery.

[Key words] atherosclerosis; Ying-Wei-Tong-Luo; vasa vasorum angiogenesis; color microsphere; VEGF

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)资助项目(2012CB518606); 河北省杰出青年科学基金(H2015106063)

[作者简介] 尹玉洁,女,硕士,主要从事中西医结合心血管疾病研究。联系电话:15633589919 E-mail:963895141@qq.com。

[通讯作者] 贾振华,男,博士生导师,主要从事中西医结合心血管疾病研究。联系电话:18503210608 E-mail:jiatcm@163.com。



动脉粥样硬化(atherosclerosis , AS) 是多种心血管病的病理基础, Ross^[1] 提出 AS 血管炎症为“由内向外”(inside-out) 反应, 以血中单核细胞向内膜黏附^[2] 和脂质过氧化为中心^[3], 认为内膜为起始和中心环节。而近年“由外向内”(outside-in) 发病机制假说的提出开始受到关注和重视, 血管外膜具有外弹性层, 广泛分布有滋养血管、神经分支及结缔组织, 且近来研究发现滋养血管(vasa vasorum, VV) 新生及密度的增加与 AS 病变密切相关^[4]。病理性内膜增厚具有血管化特征, 这类新生血管即起源于外膜 VV^[5]; 外膜 VV 被认为是炎症介质通过管壁进入斑块, 促进病程进展的通道^[6]。既往研究证实通心络和他汀类药物具有降脂、抗炎、抗氧化的作用, 且能够抑制 VV 异常增生、稳定斑块, 从而延缓动脉粥样硬化进程。“营卫通络方”——桂芍通络是撷取东汉张仲景调和营卫及历代医家运用通络法治疗血脉病变的用药经验调制的经验方, 我们为观察其对外膜 VV 的干预作用, 采用高脂饮食复合右侧颈总动脉硅胶管包裹术^[7] 建立 AS 早期管壁微血管新生模型, 阿托伐他汀和通心络作为阳性对照, 佐证《难经》提出的“损其心者, 调其营卫”, 反证营卫理论在 AS 中的指导价值。

材料与方法

1 药品

阿托伐他汀片(辉瑞制药有限公司, 批号: L14578); 通心络超微粉(石家庄以岭药业股份有限公司, 批号: S-130901); 桂芍通络超微粉(石家庄以岭药业股份有限公司, 将桂芍通络按临床所用剂量比例称取, 采用水提、醇提、油提等制备工艺, 浓缩干燥制成胶囊原粉, 每克桂芍通络超微粉相当于 6.93 g 生药)。

2 试剂

VEGF 鼠抗兔单克隆抗体(英国 Abcam 公司, 批号: ab1316); VEGFR-2 山羊多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司, 批号: sc-48161); DYE-TRAK 黄色微球(美国 Triton Technology 公司, 批号: 15TY9003); DYE-TRAK 蓝色微球(美国 Triton Technology 公司, 批号: 15TB9005); 二甲基甲酰胺(Solarbio 公司, 批号: 515A033); 聚山梨酯 80(Solarbio 公司, 批号: 304A052); Triton X-100(Solarbio 公司, 批号: 524A055); 叠氮化钠(Solarbio 公司, 批号: 1226D052)。

3 仪器

7080 全自动生化分析仪(日本日立公司);

3K15 型高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司); MDF-U50V 型 -80 °C 冰箱(Sanyo 公司)。

4 动物

健康日本大耳白兔 72 只, 雌雄各半, 体重(2.0 ± 0.3) kg。购自北京富豪实验动物养殖中心, 动物许可证号: SCXK(京) 20100010, 单笼饲养于河北省络病重点实验室, 饲料由河北医科大学实验动物中心加工定制, 恒温(20 ~ 25 °C), 恒湿(40% ~ 70%), 各 12 h 明暗周期, 每日通风。

5 动物分组及给药

适应性喂养 1 周后, 将 72 只实验兔随机分为 6 组, 即正常组、模型组、桂芍通络高剂量组、桂芍通络低剂量组、阿托伐他汀组、通心络组。正常组给予普通饲料, 模型组及各用药组实施右侧颈动脉硅胶管包裹术复合高脂饮食^[8](胆固醇 1%、猪油 5%、胆固醇 7.5% 及基础饲料 86.5%), 各治疗组于造模当天同时给予药物干预, 用 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬液将药物配置成所需浓度, 按以下剂量 *ig* 给药: 桂芍通络高剂量组 0.6 g·kg⁻¹、低剂量组 0.3 g·kg⁻¹、阿托伐他汀组 2.5 mg·kg⁻¹、通心络组 0.6 g·kg⁻¹, 给药容积 3 mL·kg⁻¹, *ig* 给药 *qd* 连续 4 周。

6 管壁微血管新生模型建立

高脂饮食复合右侧颈动脉包裹硅胶管建立管壁微血管新生模型。硅胶管包裹术如下: 实验兔经耳缘静脉注射 3% 戊巴比妥钠(1 mL·kg⁻¹) 待其麻醉后, 仰卧固定于手术台, 颈部消毒后, 沿正中线逐层剪开皮肤、筋膜, 用止血钳钝性分离右侧胸锁乳突肌, 眼科镊仔仔细游离出右颈动脉(RCA) 2.5 cm, 纵向剖开消毒后的医用硅胶管(内径 1.7 mm, 外径 3.2 mm, 长 2 cm) 并包裹于右侧颈动脉, 避免损伤鞘膜内的神经。局部滴加链霉素, 逐层缝合伤口, 术后 *bid* 连续 3 d 行局部消毒, 以防感染。

7 标本采集

术后 4 周时取材, 标本采集前禁食禁水 12 h, 3% 戊巴比妥钠(1 mL·kg⁻¹) 经耳缘静脉注射麻醉, 腹主动脉取血。备皮消毒后行颈部正中切口, 迅速分离取下术侧颈动脉, 0.9% NaCl 溶液洗净, 一部分置入 4% 多聚甲醛溶液固定, 用于苏木精-伊红(HE) 染色。另一部分液氮冻存以备 Western blot 检测。

7.1 HE 染色观察血管内中外膜病理形态变化 将已固定的标本进行脱水浸蜡包埋, 切片脱蜡, PBS 冲洗, 苏木素液浸染 2 min, 流水冲洗, 0.3% 盐酸乙醇分化, 自来水返蓝, 伊红染液 4 min, 封片, 光镜下观察。

7.2 血脂测定 腹主动脉取血, 放置 30 min, 3 500 g

离心 10 min 取血清,采用自动生化仪测定血清 TC, TG 和 LDL-C。

7.3 非放射性彩色微球检测微血管血流量 3% 戊巴比妥钠 ($1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$) 经耳缘静脉注射麻醉后,于右腹股沟处脱毛消毒并剪开皮肤,用眼科镊逐层剥离,暴露股动脉并插管(导管内预先充满 $50 \text{ IU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肝素 0.9% NaCl 溶液),用动脉夹夹闭。沿正中线剪开胸骨,暴露心脏,于左心室注射 $500 \mu\text{L}$ 黄色微球悬浮液(含 1.2×10^6 个黄色微球),10 s 内注射完毕,在黄色微球注射前 5 s 放股动脉动脉夹,持续采血 1 min (50 mL 聚丙烯离心管提前肝素抗凝)。立即处死实验动物,迅速取下术侧颈动脉,置入 15 mL 聚丙烯离心管中,分别计量血液与组织样本。黄色微球随体循环前行并嵌顿于微血管中,将组织样本的微球回收后,用有机溶剂将微球洗脱干净,采用紫外分光光度计测量吸光度值,根据 Triton Technology 公司提供的 Excel 宏文件运算组织样本管壁微血管血流量值。

7.4 Western Blot 检测颈动脉外膜 VEGF, VEGFR-2 蛋白表达 取出冻存标本,于预冷的 PBS 液中纵向剖开血管,剥离外膜吸干称重;取 100 mg 标本,加入 1 mL 细胞裂解液,充分裂解后进行蛋白定量,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,待结束后,将凝胶半干转

膜至 PVDF 膜上;封闭液封闭后,分别与 VEGF, VEGFR-2 抗体 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;室温洗膜,与稀释的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 2 h,洗膜后,抗体结合区带用化学发光法检测。以 GADPH 为内参,以目的基因吸光度值/GADPH 吸光度值的比值作为所检测标本目的蛋白的相对含量,进行数据统计分析。

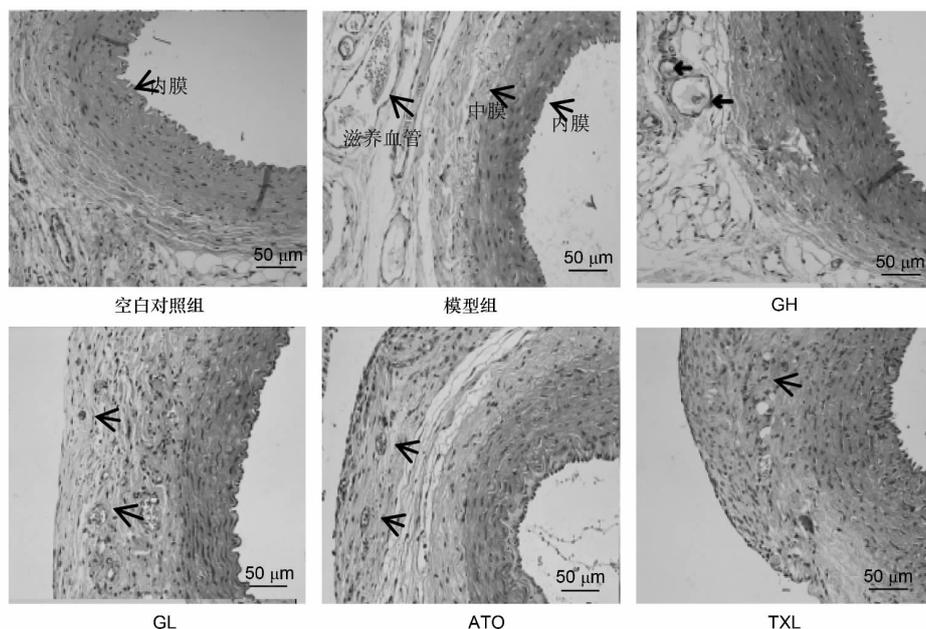
7.5 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行检验,首先进行正态性和方差齐性检验,方差齐性两两比较采用最小显著差法(LSD),方差不齐用 Dunnett's T3 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组对颈动脉病理形态干预结果

正常组颈动脉内膜光滑呈波浪状,内皮细胞结构完整连续,平滑肌细胞排列整齐;模型组内膜层弥漫性增生,内皮细胞脱落,可见少量泡沫状巨噬细胞形成,中膜间隙增宽,平滑肌细胞和弹力纤维排列紊乱,外膜滋养血管丰富;各用药组内膜层增厚程度,外膜滋养血管数量较模型组均有明显改善,见图 1。



GH: 桂芍通络高剂量组; GL: 桂芍通络低剂量组; ATO: 阿托伐他汀组; TXL: 通心络组

图 1 各组对颈动脉病理形态干预结果 ($n = 6$) ($400 \times$)

2 各组对血脂水平的干预作用

与正常组比较,模型组血清 TC, TG, LDL-C 水

平均显著升高 ($P < 0.01$); 各用药组均有一定程度降脂作用,与模型组相比差异有统计学意义 ($P <$

0.01); 各用药组之间两两比较差异无统计学意义。 见表 1。

表 1 各组对血脂水平干预作用

$n = 6 \bar{x} \pm s$

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	TC/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	LDL-C/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
空白对照组	—	2.70 ± 0.32	0.78 ± 0.29	1.00 ± 0.23
模型组	—	42.72 ± 10.99 ^a	6.01 ± 1.40 ^a	21.21 ± 6.46 ^a
桂芍通络高剂量组	600	22.77 ± 5.40 ^b	2.65 ± 0.50 ^b	5.97 ± 0.99 ^b
桂芍通络低剂量组	300	26.68 ± 5.46 ^b	2.93 ± 0.43 ^b	7.29 ± 2.94 ^b
阿托伐他汀组	2.5	16.66 ± 2.29 ^b	2.16 ± 0.35 ^b	5.79 ± 1.19 ^b
通心络组	600	21.98 ± 5.39 ^b	2.27 ± 0.74 ^b	5.98 ± 2.37 ^b

与正常组相比 a: $P < 0.01$; 与模型组相比 b: $P < 0.01$

3 各组对颈动脉管壁微血管血流量的干预作用

与正常组相比,模型组颈动脉管壁微血管血流量显著增多,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,GH组、GL组、ATO组及TXL组颈动脉管壁微血管血流量明显减少($P < 0.01$);各药物组间比较差异无统计学意义,见表 2。

表 2 各组对颈动脉管壁微血管血流量的干预作用

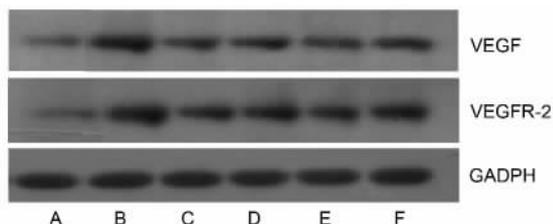
$n = 6 \bar{x} \pm s$

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	微血管血流量/ $\text{UL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$
空白对照组	—	23.05 ± 4.26
模型组	—	64.21 ± 14.48 ^a
桂芍通络高剂量组	600	33.88 ± 7.33 ^c
桂芍通络低剂量组	300	44.82 ± 11.41 ^b
阿托伐他汀组	2.5	35.09 ± 6.23 ^c
通心络组	—	36.66 ± 2.85 ^c

与正常组相比 a: $P < 0.01$; 与模型组相比 b: $P < 0.05$; c: $P < 0.01$

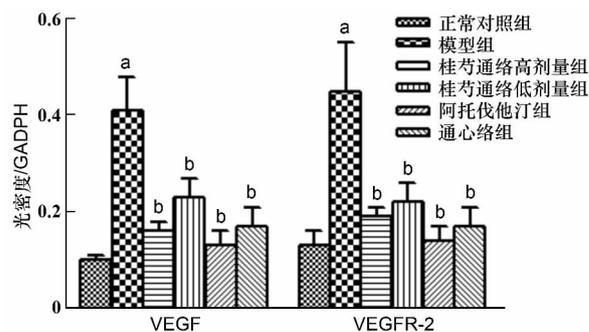
4 各组颈动脉外膜 VEGF, VEGFR-2 蛋白水平比较

与正常组相比,模型组 VEGF, VEGFR-2 蛋白水平明显上调($P < 0.01$);与模型组相比,GH组、GL组、ATO组及TXL组 VEGF, VEGFR-2 蛋白表达均显著降低($P < 0.01$);各药物组间两两比较差异无统计学意义,见图 2 和图 3。



A: 正常对照组; B: 模型组; C: 桂芍通络高剂量组;
D: 桂芍通络低剂量组; E: 阿托伐他汀组; F: 通心络组

图 2 各组颈动脉外膜 VEGF, VEGFR-2 蛋白表达 ($n = 3$)



与正常组相比 a: $P < 0.01$; 与模型组相比 b: $P < 0.01$

图 3 各组颈动脉外膜 VEGF, VEGFR-2 蛋白水平变化

讨论

国内外关于 AS 病变过程中微血管新生的病理研究多集中于促进易损斑块破裂,近年,随着对 AS 病理机制研究的逐步深入,发现 AS 早期管壁微血管结构和功能都发生改变,AV 异常增生(密度增加、分布紊乱)发生要早于内膜增生,并伴有微血管灌注量增加,且抑制微血管新生药物能够明显减少中、内膜层厚度^[9],表明微血管新生与 AS 病变发生发展密切相关。因此寻找合适的药物及早地对微血管新生进行干预,做到“既病防变”是很有必要的。众所周知,高脂血症是 AS 的重要危险因素之一,血浆脂蛋白水平与 AS 严重程度呈线性相关^[10],因此本实验室采用高脂饮食基础上复合右侧颈动脉硅胶管包裹术在短时间内建立 AS 早期管壁微血管新生模型,以探讨“营卫通络方”对 AS 早期管壁微血管新生的干预作用。

管壁微血管主要为大中动脉血管壁外膜及中膜外 1/3 提供氧气成分血液供应^[11],本实验中利用彩色微球技术测量颈动脉局部血流量,以观察管壁微

血管功能性变化。彩色微球理化性质较稳定,不被机体溶解吸收,亦不会引起弥散性微循环栓塞^[12],微球随血液循环到达并嵌顿于毛细血管网,采集组织标本中的染料,通过分光光度计测定所得,计算颈动脉局部微血管血流量,以证实颈动脉外膜滋养血管新生程度。血管内皮生长因子(VEGF)与特异性表达于血管内皮细胞的酪氨酸激酶受体 VEGFR-2 结合,促进内皮细胞存活,增生和迁移,是诱导血管新生的主要通路^[13]。本研究结果显示,模型组颈动脉管壁微血管异常增生,包括分布密度及 VEGF/VEGFR-2 蛋白表达明显增加,且颈动脉管壁微血管血流量增多,间接反应了微血管增生程度,管壁微血管的异常增生促使内膜弥漫性增生,血清 TC, TG, LDL-C 显著升高,成功建立 AS 早期管壁微血管新生模型。

“营卫通络方”桂芍通络是以营卫学说和血脉理论为指导,撷取东汉张仲景调和营卫用药经验研制而成的,以桂枝与白芍为基础方,一通卫阳,一理营阴,合以薤白疏畅营卫气机运行以防络气郁滞,以达营卫畅达,气血流行;辅以丹参、姜黄活血通络,剔除络中淤血。而他汀类药物及通心络能够降脂,对 AS 病变过程中新生血管有一定干预作用,能通过微血管内皮保护作用抑制微血管异常增生,因此采用阿托伐他汀及通心络作为阳性对照药。本研究结果显示,“营卫通络方”能够明显减少管壁新生微血管的分布密度、VEGF 及其功能性受体 VEGFR-2 的表达,下调管壁微血管灌注量,抑制内膜增生,能降低血清 TC, TG 和 LDL-C 水平,从而延缓 AS 病变进程,其中桂芍通络高剂量与阿托伐他汀、通心络疗效相当,进一步反证营卫学说在 AS 病变中的指导作用,在 AS 早期防治中具有潜在发展前景。本研究在动物整体水平角度,初步证明了“营卫通络方”能够抑制 AS 早期管壁微血管新生,但具体的调控机制有待从分子水平、基因水平进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] ROSS R. Atherosclerosis—an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115–126.
- [2] LI AC, GLASS CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention [J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1235–1242.
- [3] PALINSKI W, ORD VA, PLUMP AS, et al. ApoE-deficient mice are a model of lipoprotein oxidation in atherogenesis. Demonstration of oxidation-specific epitopes in lesions and high titers of autoantibodies to malondialdehyde-lysine in serum [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14(4): 605–616.
- [4] ARCIDIACONO MV, RUBINAT E, BORRAS M, et al. Left carotid adventitial vasa vasorum signal correlates directly with age and with left carotid intima-media thickness in individuals without atheromatous risk factors [J]. *Cardiovasc Ultrasound* 2015, 13: 20.
- [5] MORENO PR, PURUSHOTHAMAN KR, SIROL M, et al. Neovascularization in human atherosclerosis? [J]. *Circulation* 2006, 113(18): 2245–2252.
- [6] DE BOER OJ, VAN DER WAL AC, TEELING P, et al. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? [J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 41(2): 443–449.
- [7] 杨琼, 唐志晗, 武春燕, 等. 异常剪切应力促兔总颈动脉粥样硬化模型的建立 [J]. *中南医学科学杂志* 2011, 39(3): 258–261.
- [8] 肖维刚, 张秋艳, 郎艳松, 等. 通心络对高脂血症兔颈动脉粥样硬化血流速度的影响 [J]. *微循环杂志* 2013, 23(4): 8–11.
- [9] GÖSSL M, ZAMIR M, RITMAN EL. Vasa vasorum growth in the coronary arteries of newborn pigs [J]. *Anat Embryol(Berl)*, 2004, 208(5): 351–357.
- [10] 顾琼琼, 刘向群, 黄琴音对动脉粥样硬化作用机制的研究进展 [J]. *中国老年学杂志* 2011, 31(22): 4501–4503.
- [11] KUMAR V, ROBBINS SL. Robbins basic pathology [M]. 8th ed. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier 2007: 340–341.
- [12] 肖维刚, 张秋艳, 王宏涛, 等. 高脂血症对兔颈动脉壁血流量及氧供的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志* 2014, 22(9): 870–874.
- [13] 郎艳松, 秘红英, 刘红利, 等. 通心络联合阿托伐他汀、阿司匹林对家兔动脉粥样硬化早期血管外膜滋养血管新生的干预作用 [J]. *中国药理学通报* 2015, 31(1): 71–76.

编辑: 赵文锐/接受日期: 2016-03-31