



桂枝汤对高脂血症心肌缺血大鼠炎症性细胞因子的影响

焦宏¹, 马建伟¹, 陈彦静^{2*}, 鞠大宏², 向丽华², 王书强¹

(1. 河北北方学院, 河北 张家口 075000;

2. 中国中医科学院 中医基础理论研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察桂枝汤对高脂心肌缺血大鼠炎症因子的影响, 初步探讨桂枝汤对心血管保护作用的机制。方法: 60 只健康雄性 SD 大鼠, 高脂饲料、丙硫氧嘧啶及 VD₃ 喂养 12 周, 诱导高脂血症, 随机分为对照组、模型组、辛伐他汀组、桂枝汤低、高剂量组继续喂养 6 周, 于试验结束 72 h 前分 3 次腹腔注射垂体后叶素 (pit), 造成高脂心肌缺血模型。18 周末检测大鼠血清中可溶性 E-选择素 (SES) 和 CRP, NO, SOD, MDA 及心肌组织中的 SOD, MDA 含量, 免疫组化测定心肌 TNF- α 的表达。结果: 桂枝汤可降低高脂心肌缺血大鼠血清中 SES 及 CRP 的含量, 升高 NO 含量; 桂枝汤可升高血浆和心肌组织 SOD 含量、降低 MDA 含量。免疫组化结果显示, 桂枝汤可显著降低高脂心肌缺血大鼠心肌组织 TNF- α 表达。结论: 桂枝汤可能通过抑制高脂心肌缺血大鼠炎症及氧化应激反应, 发挥其保护心血管的作用。

[关键词] 桂枝汤; 高脂血症; 心肌缺血; 炎症因子; 氧化应激

冠心病是动脉粥样硬化导致器官病变的最常见类型, 中医药认为其病机特点多集中于寒、痰、瘀、虚^[1-3]。大量研究表明, 冠心病心肌缺血是一个炎症性疾病过程, 炎症被认为是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的核心发病机制, 参与了 AS 从发生到发展以及恶化的全过程。调和营卫可通过调理脾胃、祛除痰湿及机体防卫功能, 实现调气血、防治心系病证 (冠心病) 之功效^[4-5]。作者前期研究结果也发现, 调营卫代表方桂枝汤可改善心肌缺血受损后的心功能^[6], 本实验进一步观察桂枝汤对高脂心肌缺血大鼠炎症因子的影响, 探讨桂枝汤是否通过阻止过氧化损伤、减轻机体的炎症应激反应等环节, 实现对心血管系统的保护作用。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 SD 大鼠 60 只, 体重 250 ~ 270 g, 由北京大学医学部实验动物科学部提供, 合格证号 SCXK (京) 2008-0006。随机分为 5 组: 对照组、模型组、辛伐他汀组、桂枝汤 10 g 治疗组 (简称桂枝汤低剂量组)、桂枝汤 20 g 治疗组 (简称桂枝汤

高剂量组), 各组动物 12 只。

1.2 药材与试剂 高脂饲料由 10% 猪油、2% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、0.2% 丙基硫氧嘧啶、0.1% 钙片和 87.2% 普通饲料配制成。桂枝、白芍、甘草、生姜、大枣, 所有药材均购自北京同仁堂药店。按原方比例 10: 10: 7: 10: 10 配齐药物 (生姜切片, 大枣剖开) 混合, 水浴浓缩成 10, 20 g · L⁻¹。血脂测定试剂盒 (TG, TC, HDL-C, LDL-C) 购于北京中生生物工程高技术公司。TNF- α 试剂盒、E-选择素 (E-selectin) 和 C-反应蛋白 (CRP) 酶联免疫吸附测试盒、TNF- α 免疫组化试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司。NO 试剂盒 (硝酸还原酶法)、超氧化物歧化酶 (SOD) 测试盒、丙二醛 (MDA) 测试盒购自南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 动物模型建立及分组 参照文献, 建立动物模型^[7-8]。动物普通喂养 1 周适应环境。1 周后眶内采血检测血脂, 均为正常者用于试验。高脂饲料喂养 12 周, 每天 15 g, 期间按 70 万 U · kg⁻¹ 的总剂量肌肉注射给予 VD₃, 期间于第 1, 4, 8 周初分次给完, 建立大鼠高血脂及早期 AS 的模型。于实验第 12 周末大鼠禁食 12 h 断尾取血, 检查各组大鼠血清总胆固醇含量, 高脂饲料喂养各组大鼠与对照组比较, 均有明显差异之后, 各治疗组分别开始灌胃给药。

[稿件编号] 20111012011

[基金项目] 河北省中医药管理局项目 (2008103)

[通信作者] * 陈彦静, 教授, Tel: (010) 64014411-2580, E-mail: chenyj010@163.com



桂枝汤治疗组:于第 13 周起开始灌胃给药,每日 1 次。桂枝汤高、低剂量组给药剂量分别为 $20, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (含生药量), $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药,每日 1 次,连续 6 周。西药对照组:辛伐他汀 $5.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,为成人剂量的 20 倍, $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药,每日 1 次,连续治疗 6 周。正常组和模型组以相应量的生理盐水灌胃 6 周。末次给药前 72 h 开始,除对照组外,在灌胃给药 30 min 后,各组动物腹腔注射垂体后叶素 $30 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1}$,对照组给予等容量的生理盐水,连续 3 次,每次间隔 24 h,诱发冠状动脉痉挛,通过心电图测定出现明显的 ST 段压低,形成心肌缺血模型^[6]。试验于 18 周结束,从腹主动脉采血 5 mL , $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,制备血清、血浆。

2.2 血清中 SE, CRP 的检测 SE 采用酶联免疫吸附法检测, CRP 采用免疫比浊法检测。取血清按试剂盒要求操作,酶标仪比色,测定 SE, CRP 含量。

2.3 血清 NO, SOD, MDA 含量测定 每个样品取 $100 \mu\text{L}$ 血清,严格按试剂盒说明书操作,测定各管吸光度,计算相应 NO, SOD, MDA 含量。

2.4 心肌组织中 SOD, MDA 含量测定 取血后,摘取心脏,彻底清除其周围的结缔组织,冰生理盐水冲洗,每个心脏留取病理检测取材后左心室前壁心肌组织,制成 1% 冰生理盐水心肌组织匀浆,按照试剂盒要求,测定吸光度,计算 SOD, MDA 含量。

2.5 免疫组化染色检测心肌组织 TNF- α 的表达 每个心脏分别切取左心室前壁小块心肌组织,以 4% 多聚甲醛固定 24 h 后常规石蜡包埋切片,免疫组化染色。光镜下观察免疫反应阳性物质为棕黄色颗粒,每张组织片选 5 个高倍视野,根据着色强度进行比较。采用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件测定阳性颗粒积分吸光度 (IA)。

2.6 统计学处理 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据处

理采用 SPSS 11.5 统计软件。采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为统计学有显著意义。

3 结果

3.1 各组大鼠血中 NO, SES 和 CRP 含量的变化 与对照组相比,模型组血浆中 NO 含量明显降低 ($P < 0.01$);与模型组相比,阳性对照辛伐他汀组及桂枝汤高、低剂量组血浆 NO 含量均明显升高 ($P < 0.01$)。与对照组相比,模型组血清中 SES, CRP 均明显升高 ($P < 0.01$),与模型组相比,各治疗组血清中 SES 和 CRP 浓度明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明桂枝汤高、低剂量组均有显著抗炎作用 (表 1)。

表 1 各组大鼠血中 NO, CRP 和 SE 的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 The serum level of NO, CRP and SE in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	NO	SES	CRP
	$/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	$/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
对照	299.28 ± 42.18	55.38 ± 3.26	2.32 ± 0.63
模型	$134.65 \pm 27.49^{1)}$	$71.73 \pm 2.36^{1)}$	$6.97 \pm 1.12^{1)}$
辛伐他汀	$241.38 \pm 26.89^{3)}$	$60.03 \pm 2.17^{3)}$	$3.81 \pm 0.59^{3)}$
桂枝汤低剂量	$219.45 \pm 29.38^{3)}$	$65.67 \pm 2.36^{2)}$	$4.10 \pm 0.35^{3)}$
桂枝汤高剂量	$269.49 \pm 30.98^{3)}$	$59.25 \pm 2.62^{3)}$	$3.93 \pm 0.62^{3)}$

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 各组大鼠血浆、心肌组织中 SOD 活性及 MDA 含量测定 与对照组相比,模型组血浆、心肌组织中 SOD 含量明显降低 ($P < 0.01$),MDA 含量明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组相比,各治疗组血浆 SOD 含量明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),MDA 明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而且桂枝汤对心肌组织中 SOD, MDA 的影响更显著 (表 2)。

表 2 各组大鼠血浆、心肌组织中 SOD 和 MDA 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

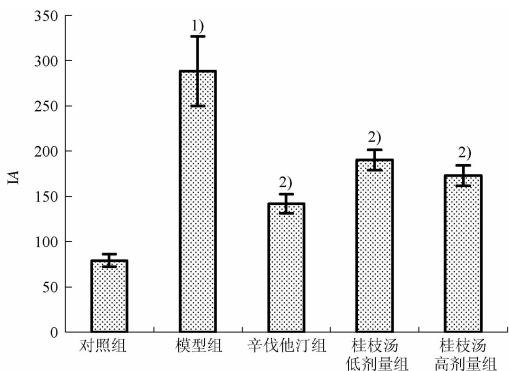
Table 2 Changes of SOD and MDA levels in serum and myocardium of different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	血浆 ($n = 8$)		心肌组织 ($n = 7$)	
	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$
对照	363.21 ± 26.89	11.24 ± 1.25	105.33 ± 16.27	2.30 ± 0.63
模型	$291.52 \pm 27.26^{2)}$	$13.27 \pm 1.48^{1)}$	$79.73 \pm 11.36^{2)}$	$3.97 \pm 1.12^{2)}$
辛伐他汀	$342.67 \pm 16.39^{3)}$	$10.92 \pm 0.99^{3)}$	$96.03 \pm 17.47^{4)}$	$2.81 \pm 0.59^{4)}$
桂枝汤低剂量	$330.86 \pm 18.82^{3)}$	$12.01 \pm 1.42^{3)}$	$89.01 \pm 11.36^{3)}$	$3.10 \pm 0.35^{3)}$
桂枝汤高剂量	$353.74 \pm 16.22^{4)}$	$11.68 \pm 1.10^{3)}$	$92.25 \pm 13.62^{4)}$	$2.93 \pm 0.62^{4)}$

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。



3.3 大鼠心肌组织中 TNF- α 免疫组化 大鼠心肌组织 TNF- α 免疫组化染色及图像分析结果显示对照组为正常心肌结构,细胞核分布均匀,肌纤维结构清晰,TNF- α 表达较低,呈阴性或弱阳性表达;模型组 TNF- α 表达呈强阳性,与对照组相比 TNF- α 蛋白含量均明显升高($P < 0.01$)。辛伐他汀组和桂枝汤组均能下调 TNF- α 的高表达,其中辛伐他汀组 TNF- α 表达降低最显著($P < 0.01$)(图 1)。



与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠心肌组织中 TNF- α 蛋白表达

Fig. 1 The protein expression of TNF- α in rat myocardial tissue

4 讨论

高脂血症被认为与动脉粥样硬化有着密切的联系。随着 1993 年 ROSS 的动脉粥样硬化炎症学说的提出,人们逐渐认识到冠心病心肌缺血是一个炎症性疾病过程,炎症被认为是 AS 的核心发病机制,参与了 AS 从发生到发展以及恶化的所有病理过程^[9]。大量临床观察也都证明炎症因子水平与高脂血症有着密切的联系^[10]。

TNF- α 作为重要的初级炎症因子,能破坏内皮细胞,刺激血管平滑肌细胞增生,促进血管新生内膜形成,促进血栓形成。研究表明,冠心病患者血清 TNF- α 水平升高^[11]。本研究发现,与正常组比较,模型组心肌组织 TNF- α 表达明显升高,桂枝汤高、低剂量组均可降低心肌组织 TNF- α 表达,说明桂枝汤和辛伐他汀一样具有明显的抑制 TNF- α 分泌的作用,从而阻断 TNF- α 直接损伤内皮细胞,使血中胆固醇不易穿透内膜,不易在管壁内沉积形成动脉粥样硬化斑块。SES 也是在炎症过程中最初出现的黏附分子,可介导白细胞的黏附和聚集,参与动脉硬化的形成^[12-13]。正常情况下,血管内皮细胞具有白

细胞抵抗,不表达 E-选择素,E-选择素只有在内皮损伤后方才表达。本研究模型组血清 SES 的水平显著升高,表明模型组大鼠血管内皮出现明显损伤,桂枝汤治疗后大鼠血清 SES 的水平显著降低,说明桂枝汤可能使大鼠血管内皮得到明显改善。

NO 作为重要的血管舒张因子,能调节血流速度,血管张力,抑制血小板聚集,黏附,防止血栓生成,防止动脉粥样硬化发生。同时有证据表明,NO 在炎症级联反应网络中起到关键的调节作用,尤其在炎症反应的发生和信号传导方面,NO 通过抑制转录因子 NF- κ B 的活化,可以向下调节机体对致炎性刺激物的应激反应程度,减少炎症因子类介质 TNF- α ,IL-1,MIP-2 的释放^[14],起到抵抗炎症发生的作用。本实验结果中,模型组大鼠血浆 NO 活性降低,桂枝汤治疗组 NO 活性升高,表明桂枝汤能有效改善高脂血症心肌缺血引起的 NO 不足,通过提高 NO 活性,减少炎症因子类介质 TNF- α 等的产生。

另外,氧化应激作为诱导心血管功能异常的病理机制,与炎症反应与内皮障碍关系密切,可启动炎症或加重炎症反应。研究表明,氧自由基引发的脂质过氧化参与心血管疾病发生及发展的整个过程^[15]。MDA 是脂质过氧化的最终产物,可作为脂质过氧化反应强弱的指标,而 SOD 是机体清除氧自由基的重要酶,可对缺血心肌起到保护作用。本研究也提示,桂枝汤可增高血清和心肌中 SOD 活性,亦能降低血和心肌中 MDA 含量,提示其具有抗氧化损伤作用,这可能是其保护心肌缺血损伤的作用机制之一。

桂枝汤为辛温解表,调和营卫之剂,历代医家亦用其治疗冠心病、慢性心肌炎等心血管疾病。现代药理研究表明桂枝汤可显著抑制佐剂性关节炎大鼠继发性关节炎关节液中 IL-1 β ,TNF- α 的活性,具有明显抗炎作用^[16],姜萍等研究发现可减少自发性糖尿病大鼠炎症因子 NF- κ B,TNF- α 和 IL-1 等蓄积,防治糖尿病心肌损伤^[17]。本研究认为,桂枝汤可能通过清除高脂心肌缺血大鼠体内过多自由基,阻止脂质过氧化损伤,减轻机体的应激反应,进而打断急性冠脉事件发生的炎症启动环节,起到对心血管系统的保护作用。

[参考文献]

[1] 姜萍. 周次清教授辨治冠心病思路谈[J]. 中医研究,2006,19(4):48.



- [2] 曹洪欣,张华. 痰瘀互结与冠心病发病机理辨识[J]. 中医药学刊,2001,19(9):544.
- [3] 路志正. 调理脾胃法在胸痹治疗中的运用[J]. 中国中医急症,1999,8(5):198.
- [4] 高荣林,朱建贵,李平,等. 路志正调理脾胃学术思想探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2006,12(2):751.
- [5] 李平,提桂香,高荣林. 路志正教授调理脾胃法在内科临床运用经验[J]. 北京中医药大学学报:中医临床版,2003,10(1):23.
- [6] 焦宏,陈彦静,鞠大宏,等. 桂枝汤对高脂血症心肌缺血大鼠心肌缺血损伤的保护作用[J]. 中国中医基础医学杂志,2011,17(3):279.
- [7] 郭延松,吴宗贵,杨军柯,等. 三种大鼠动脉粥样硬化模型复制方法的比较[J]. 中国动脉硬化杂志,2003,11(5):465.
- [8] 温进坤,韩梅,杜玮南,等. 一种快速建立动脉粥样硬化模型的实验方法[J]. 中国老年学杂志,2001,21(1):50.
- [9] Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease[J]. Nutr Rev, 2007, 65(12 Pt2): S140.
- [10] Laskin D L, Laskin J D. Macrophages, inflammatory mediators, alung injury[J]. Methods,1996,10(1):61.
- [11] 许颖,张波,苏宜香. 动脉粥样硬化相关血浆炎症标志物的研究现状[J]. 国外医学·卫生学分册,2008,35(1):60.
- [12] Yosef-Levi Grad E, Danenberg H D. C-reactive protein and atherothrombosis—a prognostic factor or a risk factor [J]. Harefuah, 2007, 146(12): 970.
- [13] Ursella S, Mazzone M, Portale G, et al. How to use the C-reactive protein in cardiac disease[J]. Minerva Cardioangiol, 2005, 53(1):59.
- [14] Mino T, Kitakaze M, sanada S, et al. Increased expression of P-selectin on platelets is a risk factor for silent cerebral infarction in patients with atrial fibrillation [J]. Circulation, 1998, 98: 1721.
- [15] Kotur-Stevuljevic J, Memon L, Stefanovic A, et al. Cor-relation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients [J]. Clin Biochem,2007,40(3/4): 181.
- [16] 周军,方素萍. 桂枝汤对大鼠佐剂性关节炎的防治作用研究[J]. 中药药理与临床,2000,16(6):1.
- [17] 姜萍,李晓,姜月华. 桂枝汤对自发性糖尿病大鼠炎症因子及心肌损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(3): 116.

Effects of Guizhi Tang on inflammatory cytokines in myocardial ischemia and hyperlipidemia rats

JIAO Hong¹, MA Jianwei¹, CHEN Yanjing^{2*}, JU Dahong², XIANG Lihua², WANG Shuqiang¹

(1. Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. Institute of Basic Theories, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Guizhi Tang on the inflammatory cytokines in myocardial ischemia and hyperlipidemia rats. **Method:** The early changes of hyperlipid and atherosclerosis are caused by utilizing multiple factors including feeding hyperlipid and propylthiouracil and high doses of vitamin D₃ for 12 weeks. Sixty male SD rats were randomly divided in to 5 groups: control group, model group, simvastatin group, low-dosage Guizhi Tang group, high-dosage Guizhi Tang group. At the end of six weeks treatment, pituitrin(pit) is abdominal cavity injected every 24 hours for a total of three times. Detecting the serum levels of SES, CRP, NO, SOD, MDA and the content of cardiac muscle tissue SOD, MDA, The expression of TNF- α in cardiac muscle tissue was detected by immunohistochemistry. **Result:** Guizhi Tang significantly decreased levels of SES, CRP and MAD, increased levels of NO and SOD, Guizhi Tang markedly decreased the level of protein expression of TNF- α in cardiac muscle tissue. **Conclusion:** Guizhi Tang may inhibit the proinflammatory factors and oxidation in myocardial ischemia and hyperlipidemia rats.

[Key words] Guizhi Tang; hyperlipidemia; myocardial ischemia; inflammation cytokine; oxidation

doi:10.4268/cjmm20121127

[责任编辑 张宁宁]