

[文章编号] 1000- 4718(2001)02- 0154- 04

# 四逆汤与维生素 E 抗血管内皮功能氧化损伤及防治家兔实验性动脉粥样硬化的比较研究\*

黄河清<sup>△</sup>, 吴伟康, 罗汉川

(中山医科大学中西医结合研究所, 广东 广州 510089)

[摘要] 目的: 观察比较具有清除氧自由基作用的复方中药四逆汤与抗氧化剂维生素 E 抗血管内皮功能氧化损伤、防治家兔实验性动脉粥样硬化(AS)的作用。方法: 运用喂饲高脂饲料造家兔实验性 AS 模型, 随机分组处理, 实验结束时, 取主动脉及血样品, 分析各组主动脉粥样斑块面积、脂代谢及血管内皮氧化损伤指标(SOD 活性、MDA 含量、NO 水平、ET 浓度)。结果: 四逆汤中、高剂量组和维生素 E 组的主动脉内膜脂质斑块面积与内皮氧化损伤变化(除维生素 E 组的 SOD 活性外)均明显轻于模型组( $P < 0.05$ ), 四逆汤组的脂代谢紊乱指标也较模型组明显改善( $P$  均  $< 0.05$ )。结论: 四逆汤抗血管内皮功能氧化损伤、防治 AS 的综合疗效较维生素 E 为优。

[关键词] 动脉粥样硬化; 内皮, 血管; 创伤和损伤; 中草药; 维生素 E

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

研究证实: 血管内皮的氧化损伤是导致动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的始动环节<sup>[1]</sup>。传统复方中药四逆汤具有扩张冠脉血管, 清除血循环和缺血心肌的氧自由基, 从能量、代谢、形态等方面对缺血心肌产生明显的保护作用<sup>[2,3]</sup>。为了进一步研究该方对心血管的作用, 我们复制家兔 AS 模型, 从血管内皮氧化损伤角度观察比较四逆汤与抗氧化剂-维生素 E 对家兔实验性 AS 的作用, 旨在探讨四逆汤抗 AS 的作用及可能机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 材料

1.1 动物 健康日本大耳白兔 40 只, 体重 1.5- 2 kg, 雌雄不拘, 5- 6 月龄, 购自本校实验动物中心。

1.2 药物及试剂 四逆汤由熟附片、干姜、炙甘草组成, 剂量比为 5: 2: 2, 由宏远制药有限公司制成半成品胶囊剂, 每粒含生药 3g。血清总胆固醇(total cholesterol, TC)及载脂蛋白 A (apolipoprotein A, apoA)、载脂蛋白 B (apolipoprotein B, apoB) 试剂为法国梅里埃生化有限公司生产, 甘油三酯(triglyceride, TG)试剂为西德豪迈公司生产, 高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂为日

本第一化学公司生产, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒由中国人民解放军海军抗衰老研究中心提供, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂如硫代巴比妥酸、钨磷酸、四乙氧基丙烷、正丁醇等均为国产分析纯。血浆内皮素(endothelins, ET)试剂盒购自北京东亚免疫技术研究所, 血清一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒由深圳晶美公司提供。

1.3 主要仪器 美国产 UV1/ UVP 计算机图象分析仪。日本(日立公司)产 7170A 全自动生化检测仪。TGL- 1G 高速台式离心机由上海医用分析仪器厂生产。SH-801V- 放免计数仪为国营二六二厂产品。752 型分光光度仪由上海第三分析仪器厂生产。

### 2 模型复制与分组

将实验兔随机分为 5 组: 正常对照组(control group)喂饲基础饲料; 模型组(model group)给予 1% 胆固醇加 5% 猪油饲料喂饲; 按人与动物体表面积比折算, 四逆汤中剂量组[middle dose group SiNi decoction, SD(M)]每兔每天每公斤体重给予含 2.1g 生药的四逆汤粉末制剂, 混合于与模型组同条件的高脂饲料中喂饲; 四逆汤高剂量组[high dose group SiNi decoction, SD(H)]每兔每天每公斤体重给予含 4.2g 生药的四逆汤粉末制剂, 混合于与模型组同条件的高脂饲料中喂饲; 维生素 E 组(vitamin E group, VitE group)每兔每天每公斤体重给予 75 mg; 后四组均在每日把造模药物或造模药物与治疗药物混合先拌于约 50 g 基础饲料中喂饲, 待食完后再补足基础饲料。

[收稿日期] 1999- 11- 22 [修回日期] 2000- 04- 03

\* [基金项目] 中国博士后科学基金资助项目

<sup>△</sup> 现在广东省第二中医院内科工作

Tel: 020- 83575734; E-mail: hhq998@263.net

每只家兔给食一般每日限制在 135– 150 g。分笼饲养,自由饮水。实验满 10 周时,取血及处死各组动物,取主动脉标本,作形态学检查,以证实模型成功。

3 实验方法与观察指标

3.1 主动脉内膜脂质斑块面积( plaque area, PA) 百分比测定 取各组动物的主动脉大体标本( 从主动脉弓至腹主动脉骼前分支), 沿正中中线剪开, 生理盐水冲洗, 滤纸吸净血迹, 铺平, 透明胶片覆盖其上, 描绘主动脉轮廓及脂质斑块大小, 应用图象分析仪测定主动脉内膜脂质斑块面积百分比。

3.2 脂代谢指标 在全自动生化检测仪上完成, TC、TG、HDL– C、LDL– C ( low density lipoprotein cholesterol) 等结果用 mmol/L 表示; 血清 apoA 与 apoB 结果用 g/L 表示。

3.3 血浆 SOD 活性测定 采用微量快速测定法, 取肝素抗凝血 100  $\mu$ L 加入盛有 5 mL 生理盐水的刻度离心管中, 2 000 r/min 离心 10 min, 弃尽上清液, 加预冷双蒸水 0.2 mL、95% 乙醇 0.1 mL、三氯甲烷 0.1 mL, 振摇片刻, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 再按试剂盒要求测定, 结果用  $1 \times 10^3$  U/L 表示; 血浆 MDA 含量测定采用改良的八木国夫法, 结果用  $\mu$ mol/L 表示。

3.4 血清 NO 水平测定 采用酶法, 先取血清 500  $\mu$ L, 加入 35% 磺基水杨酸 100  $\mu$ L 沉淀蛋白, 3 000 r/min, 离心 10 min, 取上清液 100  $\mu$ L, 然后按试剂盒

要求进行操作。目前以血清  $\text{NO}_3^-$  与  $\text{NO}_2^-$  浓度之和作为 NO 生成的良好指标, 本盒用硝酸还原酶特异性地将  $\text{NO}_3^-$  还原为  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  与显色剂作用生成有色物质, 通过显色深浅测定浓度高低, 吸光度(A) 值大小代表 NO 水平。结果用  $\mu$ mol/L 表示。

3.5 血浆 ET 浓度测定 采用放射免疫法, 按试剂盒操作说明进行, 结果用 ng/L 表示。

4 统计学处理

应用 WIN98 中的 SPSS8.0 软件进行统计分析。具体方法为: 完全随机分组的多组均数比较的单因素方差分析(LSD) 法, 直线回归等。数据结果用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

结 果

1 PA 百分比测定结果

对照组为 0, 模型组为( 68  $\pm$  13) %, 四逆汤组中剂量组为( 54  $\pm$  11) %, 四逆汤高剂量组为( 42  $\pm$  9) %, 维生素 E 组为( 58  $\pm$  8) %, 四逆汤中、高两个剂量组、维生素 E 组与模型相比差异明显( 分别为  $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ ), 四逆汤高剂量组疗效优于中剂量组、维生素 E 组, ( $P < 0.05$ )。

2 血清 TC、TG、HDL– C、LDL– C、apoA、apoB 等检测结果, 见表 1。

3 血浆 SOD 活性、血浆 MDA 含量、血清 NO 水平、血浆 ET 浓度等检测结果( 见表 2)

表 1 四逆汤、维生素 E 对血清 TC、TG、HDL– C、LDL– C、apoA、apoB 的影响

Tab 1 The effect of SiNi decoction and VitE on serum TC, TG, HDL– C, LDL– C, apoaA, apoB( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Group	Control group	Model group	SD (M) group	SD (H) group	VitE group
T C (mmol/L)	0.59 $\pm$ 0.16*	47.31 $\pm$ 11.49	38.21 $\pm$ 14.39*	23.13 $\pm$ 6.78* $\Delta$	43.69 $\pm$ 18.12
T G (mmol/L)	0.75 $\pm$ 0.24*	3.61 $\pm$ 2.66	3.10 $\pm$ 1.61*	1.10 $\pm$ 0.59* $\Delta$	3.45 $\pm$ 1.59
HDL– C (mmol/L)	0.23 $\pm$ 0.21*	2.58 $\pm$ 1.13	2.24 $\pm$ 0.55	1.65 $\pm$ 0.36*	2.12 $\pm$ 1.09
LDL– C (mmol/L)	0.46 $\pm$ 0.23*	43.13 $\pm$ 11.45	34.58 $\pm$ 14.07*	21.00 $\pm$ 6.36* $\Delta$	40.15 $\pm$ 9.89
ApoA (g/L)	0.46 $\pm$ 0.22	0.55 $\pm$ 0.41	1.34 $\pm$ 1.17*	1.30 $\pm$ 1.19*	0.77 $\pm$ 0.54
ApoB (g/L)	0.02 $\pm$ 0.01*	1.04 $\pm$ 0.88	0.78 $\pm$ 0.32*	0.23 $\pm$ 0.196* $\Delta$	0.95 $\pm$ 0.68

\*  $P < 0.05$  vs model group;  $P < 0.05$  SD (H) group vs SD (M) group.

表 2 四逆汤、维生素 E 对血浆 SOD 活性、血浆 MDA 含量、血清  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  水平、血浆 ET 浓度的影响

Tab 2 The effect of SiNi decoction and VitE on plasma activity of SOD, plasma content of MDA, serum level of  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ , plasma density of ET( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Group	Control group	Model group	SD (M) group	SD (H) group	VitE group
SOD (U/L)	200.53 $\pm$ 21.8*	141.47 $\pm$ 28.98	170.43 $\pm$ 6.25*	186.19 $\pm$ 9.06*	141.38 $\pm$ 22.51
MDA (nmol/L)	7.34 $\pm$ 1.01*	17.23 $\pm$ 3.27	12.28 $\pm$ 0.71*	12.23 $\pm$ 3.97*	11.37 $\pm$ 1.72*
$\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ( $\mu$ mol/L)	95.47 $\pm$ 5.37*	68.45 $\pm$ 6.41	77.70 $\pm$ 1.18*	86.82 $\pm$ 3.53*	74.60 $\pm$ 6.81* $\Delta$
ET (ng/L)	72.46 $\pm$ 12.77*	151.73 $\pm$ 44.06	113.43 $\pm$ 54.62*	94.62 $\pm$ 35.09*	112.11 $\pm$ 44.86*

\*  $P < 0.05$  vs model group;  $\Delta P < 0.05$  VitE vs SD dose (H).

从表 1 看出,模型组的 TC、TG、LDL-C、apoB 均显著高于对照组,虽 HDL-C 亦代偿性升高,但远低于 TC、LDL-C 的升高幅度。四逆汤中剂量组与四逆汤高剂量组均低于模型组的 TC、TG、LDL-C、apoB 含量,特别是四逆汤高剂量组疗效显著;同时四逆汤制剂 apoA 含量也高于模型组。维生素 E 组与模型组相比,无显著差异。

从表 2 看出,模型组血浆 SOD 活性、血清 NO 水平显著低于对照组,而血浆 MDA 含量、血浆 ET 浓度显著高于对照组( $P < 0.05$ )。四逆汤中剂量与高剂量治疗组,则能显著提高血浆 SOD 活性、血清 NO 水平,降低血浆 MDA 含量、血浆 ET 浓度( $P < 0.05$ ),四逆汤高剂量组在提高血浆 SOD 活性和血清 NO 含量方面疗效更佳。维生素 E 组虽能降低血浆 ET 浓度、血浆 MDA 含量,提高血清 NO 水平,但对血浆 SOD 活性无影响。

## 讨 论

现已公认高脂血症(主要为高胆固醇血症)是 AS 病变的最重要的原因。高胆固醇血症对动脉内皮的损伤是通过氧化损伤机制产生的,高胆固醇血症增加动脉壁细胞内自由基释放系统的活性,使氧自由基及其它活性氧成分释放增多,动脉壁的脂质过氧化损伤,导致大量的低密度脂蛋白被氧化;另一方面,高脂固醇血症又直接损伤动脉壁的抗氧化机能,使动脉壁内的超氧化物歧化酶(SOD)活性降低,导致脂质过氧化物清除障碍,其分解代谢产物——丙二醛(MDA)含量增加,加重局部血管内皮细胞的病理损伤和血管调节失常<sup>[4]</sup>。

由完整血管内皮细胞得以合成、释放的内皮依赖性舒张因子(EDRF)/一氧化氮(NO)具有扩张血管、抑制多种血细胞对内皮的粘附和损伤、抑制血小板活化聚集、抗血管平滑肌细胞增生等作用。而血管内皮收缩因子 ET,则有收缩血管、促使血小板粘附聚集等作用。NO 和 ET 之间的平衡是体循环调节和局部血流灌注的主要决定因素<sup>[5]</sup>。当内皮被氧化损伤、AS 发生时,血循环中 NO 的基础释放和水平减低,而血浆 ET 浓度则明显增高<sup>[6]</sup>,本实验结果亦证实了这一点。这种 NO 与 ET 间平衡的破坏,是动脉内皮受损的显著特征,并参与 AS 进程,促使动脉粥样硬化的发生、发展。

AS 的中医病机为脾肾等脏气虚弱为本、瘀血痰

浊阻滞为标,本虚标实,因虚致实。阳气为人体生命活动的原动力,具有温运推动脏腑组织功能活动、血脉运行及化生水谷精微等功能,“急则治其标,缓则治其本”,多发于中老年人的病理进展较缓慢的 AS 采用温补脾肾阳气为主的治本法将振奋脾肾功能,有利于气血津液的生成和水津的代谢、血脉的正常运行与脏腑功能的协调,从而使因脏腑虚弱所致的继发性病理产物—瘀血、痰浊得以逐渐解除,比单用活血化瘀的治标法或以治标为主、治本为辅的标本同治法更切中 AS 病机的实质,对于逆转 AS 脂质斑块病变、控制发展、防止复发等应具有更主要的临床治疗意义。复方中药四逆汤是温肾健脾、回阳固本的经典方,因此适宜于 AS 的防治。

维生素 E 是目前通用的防治 AS 的抗氧化剂。本研究发现:四逆汤能够提高血浆 SOD 活性、降低 MDA 含量,减轻家兔实验性 AS 时血管内皮的氧化损伤,进而提高血清的 NO 水平,降低血浆 ET 浓度,以调节 NO/ET 的平衡,改善血管舒缩功能;抗氧化剂维生素 E 与四逆汤相比,在降低 MDA 的含量、调节 NO/ET 的平衡上疗效接近,但无提高 SOD 活性的作用。四逆汤还能有效调节脂代谢紊乱,减少了高胆固醇血症对血管内皮的氧化损伤。实验结果显示四逆汤对实验性 AS 抗血管内皮的氧化损伤、减轻动脉脂质斑块的综合作用优于抗氧化剂维生素 E。值得进一步研究其作用与机理。

## [参 考 文 献]

- [1] 周 枚,陈 瑗. 内皮细胞脂质过氧化损伤与动脉粥样硬化[J]. 中华心血管病杂志,1990,18(4): 248- 249.
- [2] 吴伟康,侯 灿,罗汉川,等. 四逆汤清除氧自由基及抑制心肌脂质过氧化反应的体外实验[J]. 中国中药杂志,1995,20(11): 68- 69.
- [3] 吴伟康,侯 灿,罗汉川,等. 四逆汤改善缺血心肌能量代谢的作用及机制探讨[J]. 中国病理生理杂志,1998,14(6): 634- 635.
- [4] Keaney JF, Jr Vita JA. Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection[J]. Prog Cardiovasc Dis, 1995,38(2): 129- 148.
- [5] Lemman A, Burnett JC. Inter and altered endothelium in regulation of vasomotion[J]. Circulation, 1992,86(6): 12- 19.
- [6] Lefer AM, Ma XL. Decreased basal nitric oxide release in hypercholesterolemia increases neutrophil adherence to rabbit coronary artery endothelium[J]. Arterioscler Thromb, 1993,13(7): 771- 774.

# The comparative study on SiNi- decoction and VitE against oxidative injury of vascular endothelial function and their preventive and therapeutic action on experimental atherosclerosis in rabbits

HUANG He- qing, WU Wei- kang, LUO Han- chuan

(Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Sun Yat- sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

**[ Abstract ]** **AIM:** To compare effects of SiNi- decoction and Vitamin E on vascular endothelial function of experimental atherosclerosis rabbits and their therapeutic action on atherosclerosis. **METHODS:** The model of experimental atherosclerosis rabbits fed with forage of high lipid was established and treated in groups randomly. At the end of the experiment, samples of aorta and blood were taken and the percentage of lipid plaque area of aortic endothelium, lipid metabolism and vascular endothelial oxidative injury (SOD activity, MDA content, NO level, endothelin concentration) of each group were analyzed. **RESULTS:** In comparison with model group, the percentage of the lipid plaque area of aortic endothelium and endothelial oxidative injury (except for SOD of VitE group) of SiNi- high and mid- dose group and VitE group are reduced obviously ( $P < 0.05$ ), and the index of lipid metabolism of SiNi- decoction group is improved ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** The comprehensive therapeutic effects of SiNi decoction on vascular endothelial oxidative injury and atherosclerosis are superior to VitE.

**[ MeSH ]** Atherosclerosis; Endothelium, vascular; Wounds and injuries; Drugs, Chinese herbal; Vitamin E

## 全国临床心脑血管病学术会议征文通知

由中国药理学学会和青岛市医学会联合主办的“全国临床心脑血管病学术会议”定于2001年5月在山东省青岛市召开,现将会议征文有关事项通知如下:

1. 征文内容: 心脑血管疾病的基础与应用基础研究; 心脑血管疾病的临床研究; 心脑血管药理的基础与应用基础研究; 心脑血管疾病介入治疗学研究; 心脑血管疾病药物治疗学研究; 心脑血管疾病护理; 临床研究方案的设计与统计方法研究等。

2. 论文撰写要求: 所投论文必须是未公开发表的学术论文,或具有本人研究工作的综述。声明无一稿多投,文稿首页加盖单位公章,文责自负。参照《中国临床药理学与治疗学》杂志论文格式要求撰写,中英文摘要按结构式书写。来稿最好打印或通

过E-mail投稿。每篇论文需交审稿费30元。

3. 论文截稿日期: 2001年3月30日,逾期不予受理。

4. 入选论文将以全文、摘要形式分期刊登于《中国临床药理学与治疗学》杂志(CN34-1206/R, ISSN 1009-2501)和《青岛医药卫生》杂志(CN37-1249/R, ISSN 1006-5571)。

5. 来稿请寄: 安徽省芜湖市皖南医学院弋矶山医院内:《中国临床药理学与治疗学》杂志编辑部收,邮政编码241001,信封上请注明“心脑血管病学术会议”。

6. 联系电话: 0553-5738856-2333, 0553-5738350

E-mail: [editorys@mail.ahwhptt.net.cn](mailto:editorys@mail.ahwhptt.net.cn)

中国药理学学会《中国临床药理学与治疗学》编辑部  
青岛医学会《青岛医药卫生》编辑部

2000年8月