

[doi: 10.3969/j.issn.1006-7795.2016.03.020]

• 基础研究 •

芪黄疽愈方对大鼠肢体动脉硬化闭塞症的实验研究

张欣¹ 刘远¹ 葛建立^{1*} 宋易华¹ 马云龙¹ 李晓东²

(1. 河北省中医院外科, 石家庄 050001; 2. 石家庄市中医院脉管科, 石家庄 050001)

【摘要】 目的 建立动物模型, 观察芪黄疽愈方对大鼠肢体动脉硬化闭塞症(arteriosclerosis occlusive disease, ASO) 的治疗作用。方法 60只Wistar大鼠采用高脂饮食喂饲联合隐动脉内膜损伤的方法制作大鼠ASO模型, 以西洛他唑为对照, 观察芪黄疽愈方各浓度组对大鼠血脂、血流变指标的不同影响。结果 中药高浓度组、西药组大鼠血清总胆固醇、三酰甘油、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、全血黏度(高切、低切)、红细胞聚集指数及红细胞刚性指数均显著低于模型组, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 中药高浓度组、西药组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 芪黄疽愈方可改善脂质代谢紊乱, 降低血脂水平, 改善血流变, 达到治疗肢体动脉硬化闭塞症的目的。

【关键词】 芪黄疽愈方; 动脉硬化闭塞症; 血脂; 血流变; 实验研究

【中图分类号】 R 289; R 543.5

Experimental study of Qi Huang Ju Yu Fang on rat limb arterial occlusive disease

Zhang Xin¹, Liu Yuan¹, Ge Jianli^{1*}, Song Yihua¹, Ma Yunlong¹, Li Xiaodong²

(1. Department of Surgery, The Traditional Chinese Medicine Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050001, China; 2. Department of Angiology Surgery, The Traditional Chinese Medicine Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050001, China)

【Abstract】 Objective To establish the animal model and observe the therapeutic effect of Qi Huang Ju Yu Fang on limb arterial occlusion in rats. **Methods** Totally 60 Wistar rats were fed with high fat diet combined with the method of saphenous artery intima injury to make the (arteriosclerosis occlusive disease, ASO) model of rats; to observe the therapy effect in the different concentration groups on serum lipids, blood rheology indexes of the rats compared with Cilostazol as control group. **Results** Serum total cholesterol, triglyceride, low density lipoprotein, whole blood viscosity (high shear, low shear), erythrocyte aggregation index, erythrocyte rigidity index in high dose concentration of Chinese medicine groups and control group were remarkably lower than those in the model group. The statistical result is of great significance ($P < 0.01$). While the difference between high dose concentration of Chinese medicine group and control group was not significant, and there was no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion** Qi Huang Ju Yu Fang can treat extremity arteriosclerosis obliterans by improving the disorder of lipid metabolism, reducing blood lipid levels, improving blood rheology.

【Key words】 Qi Huang Ju Yu Fang; arteriosclerosis occlusive disease; blood lipid; blood rheology; experimental study

下肢动脉硬化闭塞症(arteriosclerosis occlusive disease, ASO) 主要由下肢动脉发生粥样硬化性改变而引起患者动脉狭窄或闭塞, 局部组织缺血、缺氧或坏死及高凝状态导致微循环功能障碍所致^[1]。近年来, 随着发病率增高, 中西医结合治疗下肢动脉硬化闭塞症被越来越多的患者所接受。芪黄疽愈方治疗下肢动脉硬化闭塞症是多年临床经验的总结, 现为探讨其科学性, 笔者以大鼠为动物模型, 从实验角度研究其作用机制, 现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8~10个月龄清洁级Wistar大鼠60只, 体质量(200±20)g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 实验动物质量合格证号: 1504024。

1.2 实验试剂及仪器

生化分析仪(日立7600-020生化仪)、血流变分析仪(众驰伟业ZL9000plus)。

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(14277760D)。This study was supported by Science and Technology Support Project of Hebei Province (14277760D)。

* Corresponding author, E-mail: gejianli591107@sohu.com

网络出版时间: 2016-06-07 19:07 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3662.r.20160607.1907.044.html>

1.3 药物

1) 高脂饲料(配比为83.5%基础饲料,5%猪油,1%胆固醇,0.5%胆酸钠及10%蛋黄粉^[2],其中:胆固醇、胆酸钠、蛋黄粉均购于石家庄市勃盛化学试剂有限公司,猪油购于市场)。

2) 注射用前列地尔干乳剂(重庆药友制药有限公司);西洛他唑片(浙江大冢制药有限公司);维生素D₃注射液(上海通用药业)。

3) 中药芪黄疽愈方(黄芪20g、黄精12g、红花12g、鬼箭羽12g、土鳖虫9g、鸡血藤15g、延胡索12g、牛膝9g、海藻12g)按原方的组方比例,并根据体表面积的比率折算出200g大鼠的等效用剂量作为其用量,另取其1/2剂量和2倍剂量作为芪黄疽愈方低浓度和芪黄疽愈方高浓度组,于河北省中医院药剂科统一购买饮片,并请河北省中医院药剂科主任鉴定,符合《中华人民共和国药典》(2005版)各项的规定,由河北省中医院煎药室煎制,4℃冰箱保存,芪黄疽愈方组的最终浓度为:生药0.75g/mL,低浓度组为:生药0.35g/mL,高浓度组为:生药1.5g/mL,实验过程中每次中药制剂均按同一标准进行。

1.4 实验方法

1) 模型制作:联合采用高脂饮食喂饲及隐动脉内膜损伤的方法制作大鼠ASO模型^[3]。①实验前适应性喂养1周,排除饮食异常大鼠,高脂饲料喂养1周。②于清洁动物实验室内用1%(质量分数)戊巴比妥钠(1mL/200g)腹腔注射麻醉,每只大鼠取左后肢消毒,从腹股沟中点向后肢内侧纵行切开皮肤,分离并暴露隐动脉,用动脉夹阻断隐动脉远近端约1.5~2.0cm,取胰岛素注射器1支,沿隐动脉血管长轴由远端向近端刺入血管腔,将0.2~0.3mL注射用无菌蒸馏水缓慢注入阻断部位血管,至血管充盈为止,5min后取下针头和动脉夹,压迫止血,缝合切口,内膜损伤模型完成,共造模50只大鼠。

2) 实验分组:采用数字表法随机分为6组,每组10只。模型组、芪黄疽愈方高浓度组、芪黄疽愈方低浓度组、芪黄疽愈方中浓度组、西药组、空白组。

3) 给药方法:空白组:普通饮食喂养,自由饮水。模型组:高脂饲料喂养,并且在实验开始时在大鼠右下肢肌肉注射维生素D₃针剂($3 \times 10^5 \mu\text{g}/\text{kg}$),每隔30d重复一次;给予0.9%(质量分数)氯化钠注射液(1mL/100g大鼠)灌胃,每日1次,连续12周,自由饮水。中药组(芪黄疽愈方低浓度组、芪黄疽愈方中浓

度组、芪黄疽愈方高浓度组):高脂饲料喂养,并且在实验开始时在大鼠右下肢肌肉注射维生素D₃针剂($3 \times 10^5 \mu\text{g}/\text{kg}$),每隔30d重复1次;给予前列地尔 $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射,每日1次,持续2周;各组给予相应浓度中药灌胃(1mL/100g大鼠),每日1次,连续12周,自由饮水。西药组:高脂饲料喂养,并且在实验开始时在大鼠右下肢肌肉注射维生素D₃针剂($3 \times 10^5 \mu\text{g}/\text{kg}$),每隔30d重复1次;给予前列地尔 $0.4 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 腹腔注射,每日1次,持续2周;西洛他唑(18mg/kg)灌胃,每日1次,连续12周,自由饮水。

1.5 标本采集及处理方法

麻醉大鼠方法同前,腹部消毒,剪开皮肤,由腹主动脉采血2~4mL用于血脂检测,4~5mL用于血流变学检测。

1.6 指标检测

血脂测定:在全自动生化分析仪上测定总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol, VLDL-C)。

血流变测定:使用血流变分析仪分析各标本全血黏度(高切、低切)、红细胞聚集指数及红细胞刚性指数等指标。

1.7 统计学方法

采用SPSS11.0进行统计分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较,采用单因素方差分析或秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芪黄疽愈方对动脉硬化闭塞症模型大鼠血脂的影响

与正常组比较,模型组大鼠血清TC、TG、LDL-C明显上升,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,西药组、中药高浓度组大鼠血清TC、TG、LDL-C下降明显,差异有统计学意义($P < 0.01$);与西药组比较,中药高浓度组血清TC、LDL-C、TG差异无统计学意义($P > 0.05$)。而针对大鼠血清HDL-C,各组进行两两比较,中、高浓度组指标升高明显,与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),与西药组差异无统计学意义($P > 0.05$),详见表1。

2.2 芪黄疽愈方对动脉硬化闭塞症模型大鼠血流变的影响

2.2.1 芪黄疽愈方对动脉硬化闭塞症模型大鼠全血黏度的影响

模型组全血黏度各切变率值均较空白组升高 ($P < 0.01$), 提示血液黏度明显增高。给予芪黄疽愈方的中药组其全血黏度各切变率值均降低, 以高浓度组作用更明显 ($P < 0.05$), 其中低切变率随中药浓度升高, 效果越好; 中切变率数据呈现出模型组全血黏度升高, 治疗组降低的趋势。西药组也有降低全血黏度的作用 ($P < 0.01$), 且西药组与高浓度组比较, 各切变率均无统计学意义 ($P < 0.05$), 提示芪黄疽愈方组降低全血黏度作用与西药组相当, 详见表 2。

2.2.2 芪黄疽愈方对动脉硬化闭塞症模型大鼠高切指数及低切指数的影响

与空白组比较, 模型组高切指数及低切指数升高 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义。给予芪黄疽愈方中药后, 两组数值均降低, 其中以芪黄疽愈方高浓度组作用明显 ($P < 0.01$); 西药组与模型组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 但与芪黄疽愈方高浓度组差异不大, 无统计学意义, 详见表 2。

2.2.3 芪黄疽愈方对动脉硬化闭塞症模型大鼠红细胞聚集指数的影响

模型组红细胞聚集指数均高于空白组, 提示模型组大鼠血流变学的异常。与模型组比较, 芪黄疽愈方中浓度、高浓度、西药组都与模型组有差别, 均比模型组降低, 差异有统计学意义, 详见表 2。

表 1 大鼠血脂检测结果

Tab. 1 The result of rats serum lipids test

($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

Group	TC	TG	HDL-C	LDL-C	VLDL-C
Control	1.80 ± 0.08	0.72 ± 0.09	0.63 ± 0.08	1.03 ± 0.08	0.43 ± 0.07
Model	2.98 ± 0.55**	1.44 ± 0.31**	0.43 ± 0.06**	2.27 ± 0.38**	0.80 ± 0.13**
Low dose	2.75 ± 0.14 [#]	0.89 ± 0.08 ^{##}	0.42 ± 0.08 [#]	2.21 ± 0.17 [#]	0.76 ± 0.15 [#]
Middle dose	2.51 ± 0.38 ^{##}	0.82 ± 0.07 ^{##}	0.46 ± 0.06 [#]	2.04 ± 0.16 [#]	0.69 ± 0.07 [#]
High dose	2.24 ± 0.16 ^{##}	0.76 ± 0.07 ^{##}	0.50 ± 0.09 ^{##}	1.72 ± 0.22 ^{##}	0.59 ± 0.08 ^{##}
Western medicine	2.26 ± 0.27 ^{##}	0.83 ± 0.14 ^{##}	0.47 ± 0.04 ^{##}	2.05 ± 0.09 ^{##}	0.69 ± 0.07 ^{##}

** $P < 0.01$ vs control; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs model group; TC: total cholesterol; TG: triglyceride; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; VLDL-C: very low density lipoprotein cholesterol.

表 2 大鼠血流变检测结果

Tab. 2 The result of rats blood rheology test

($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	WBVisc. (1 s^{-1})	WBVisc. (5 s^{-1})	WBVisc. (30 s^{-1})	WBVisc. (200 s^{-1})	WBRLV(H)	WBRLV(L)	EAI	ESI
Control	14.23 ± 2.14	7.86 ± 0.97	5.56 ± 0.44	4.27 ± 0.33	3.32 ± 0.24	13.99 ± 1.69	4.69 ± 0.08	4.34 ± 0.39
Model	22.02 ± 2.29**	10.85 ± 0.98**	7.37 ± 1.76**	6.09 ± 1.52**	5.03 ± 1.33**	16.73 ± 1.77**	5.84 ± 1.21**	5.42 ± 0.94**
Low dose	17.26 ± 2.43 ^{##}	9.54 ± 0.52 [#]	6.91 ± 1.41 [#]	5.03 ± 1.38 [#]	4.26 ± 0.92 [#]	15.20 ± 2.37 [#]	5.52 ± 0.71 ^{##}	4.65 ± 0.20 ^{##}
Middle dose	17.10 ± 2.26 ^{##}	9.07 ± 1.24 [#]	6.85 ± 1.12 [#]	4.78 ± 0.80 ^{##}	3.72 ± 0.60 ^{##}	14.53 ± 2.78 [#]	4.44 ± 0.66 ^{##}	4.81 ± 0.58 ^{##}
High dose	16.00 ± 1.13 ^{##}	8.69 ± 0.24 ^{##}	6.11 ± 0.75 [#]	4.33 ± 0.44 ^{##}	3.22 ± 0.66 ^{##}	14.35 ± 0.76 [#]	4.46 ± 0.21 ^{##}	4.17 ± 0.16 ^{##}
Western medicine	15.68 ± 1.96 ^{##}	7.81 ± 0.88 ^{##}	7.22 ± 0.48 [#]	4.08 ± 0.68 ^{##}	3.16 ± 0.62 ^{##}	14.43 ± 2.09 [#]	4.68 ± 0.96 ^{##}	4.15 ± 0.63 ^{##}

** $P < 0.01$ vs control; [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs model group; WBVisc. (1 s^{-1}): whole blood viscosity (1 s^{-1}); WBVisc. (5 s^{-1}): whole blood viscosity (5 s^{-1}); WBVisc. (30 s^{-1}): whole blood viscosity (30 s^{-1}); WBVisc. (200 s^{-1}): whole blood viscosity (200 s^{-1}); WBRLV(H): whole blood relative viscosity at high-shear rate; WBRLV(L): whole blood relative viscosity at low-shear rate; EAI: erythrocyte aggregation index; ERI: erythrocyte rigidity index.

4 讨论

目前, 对于 ASO 动物模型, 学术界尚未达成统一, 近年来, 运用兔子、小鼠、大鼠、鹌鹑等成功地建立了大量高脂饲料、单纯药物、高脂饲料加药物、基因敲除鼠及基因工程模型等诱导的动物模型^[4]。但大鼠具有饲养方便、抵抗力强, 食性与人相近的特点, 能在短时间内制成 ASO 模型, 且能较好地模拟人 ASO 的病理变化。车兆义等^[3]也通过实验证实, 蒸馏水损伤动脉内

膜加高脂、高胆固醇等饲料喂养可较快形成与人动脉硬化闭塞症相似的、较成熟的大鼠动脉硬化闭塞症模型。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的主要原因是胆固醇沉积于血管内膜, 形成脂质斑块, 使管腔狭窄, 严重时斑块破裂出血, 血栓形成, 使管腔完全或不完全阻塞, 相应的组织器官发生缺血或缺血性坏死, 从而发生严重的心血管事件 (cardiovascular events, CVE)^[5]。肢体动脉硬化闭塞症是动脉粥样硬化在四

肢的表现,是临床主要表现为肢体缺血及微循环障碍的一种慢性疾病。临床主要表现为:肢体发凉、麻木、间歇性跛行、静息痛,甚至发生坏疽,积极寻求有效的治疗方法对于缓解患者临床症状、控制和延缓ASO的发展有着重要的意义。

下肢动脉硬化闭塞症属于中医“脱疽”范畴。明代陈实功的《外科正宗·脱疽论》^[6]：“夫脱疽者，外腐而内坏也，此因平昔厚味膏粱熏蒸脏腑，丹石补药消烁肾水，房劳过度，气竭精伤”是对动脉硬化闭塞症的形象描述。对于其治疗，历代医家均有研究记载。《灵枢·痈疽篇》“……急斩之，则不死矣”；唐代孙思邈在《千金翼方》有“在肉则割，在骨则切”的主张；薛己《外科枢要》^[7]对脱疽一病有非常详细的论述，除内服药物外，还采用针灸、手术、外用药等疗法，且附验案数个。现代秦学贤提出消、托、补三法治疗动脉硬化闭塞症的不同阶段^[8]。侯玉芬等^[9]应用补阳还五汤加减口服兼外洗配合溶栓胶囊治疗，疗效明显。

芪黄疽愈方是本科三十多年临床经验的总结，针对脱疽病气阴两虚、经络癥积瘀结的病证，西医主要为下肢动脉硬化闭塞症，或兼糖尿病的患者，经过大量的临床实践，疗效确切。在前期临床观察中，芪黄疽愈方对于循环评分、跛行指数及踝肱比的近期疗效与西药组差异无统计学意义($P > 0.05$)，远期疗效明显高于西药组。笔者认为，脱疽患者素体气阴两虚，气虚推动无力，气血津液输布异常，津凝为痰，血滞为瘀，痰瘀互结为癥，最终导致痰瘀阻络，经脉不通而发病。可见，气阴两虚为本，经络癥积瘀结为标，其病位在血脉，为本虚标实之证。芪黄疽愈方遣方用药以滋阴益气、消癥散结、通经活络为大法，以黄芪、红花为君药，其中黄芪补气固表，红花活血化瘀；以黄精、鬼箭羽、鸡血藤、延胡索、土鳖虫、海藻为臣药，其中黄精助黄芪补气，同时能养阴益肾，鬼箭羽、延胡索、鸡血藤活血通经止痛，土鳖虫、海藻化痰散结，共助红花活血通经、散瘀止痛；牛膝引药下行为使药，诸药合用，益气滋阴，气旺血行，瘀散络通，诸症自可渐除。

现代药理学研究^[10-11]表明，黄芪中的黄芪甲苷对促血管生成、心肌发育、增强心肌功能等基因有上调作用。红花可使全血黏度降低，血小板聚集受到抑制，红细胞的变形能力提高，从而达到了延长凝血时间、抗血栓的功效^[12]。鸡血藤总黄酮可促进血虚动物模型造血功能

的恢复，具有抗贫血的作用，其机制可能与促进白细胞介素-3(interleukin-3, IL-3)的分泌及调节促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)水平有关^[13]。鬼箭羽能够改善血液的黏稠凝聚、降低血黏度、消融动脉粥样硬化斑块，还可以解除血管痉挛并修复受损的血管内皮，因此对心肌缺血、高脂血症及各种脑血管疾病均有疗效^[14]。

本实验研究结果表明，芪黄疽愈方具有降低血脂、改善血流变的作用，为芪黄疽愈方对肢体动脉硬化闭塞症的治疗作用提供了科学依据，为肢体动脉硬化闭塞症的治疗提供了新的途径。

5 参考文献

- [1] 吴刚. 补阳还五汤加味治疗下肢动脉硬化闭塞症 44 例[J]. 河南中医, 2015, 35(9): 2217-2219.
- [2] 高莹, 李可基, 唐世英, 等. 几种高脂血症动物模型的比较[J]. 卫生研究, 2002, 31(2): 97-99.
- [3] 车兆义, 宋清斌, 张继文, 等. 大鼠动脉硬化闭塞模型两种构建方法的比较[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(50): 9841-9844.
- [4] 李迎新, 黄霖. 动脉粥样硬化动物模型制作方法的介绍[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18: 70-73.
- [5] 张建义, 李建周, 刘娟, 等. 中药罗汉果抗血脂紊乱的实验研究[J]. 中国医药指南, 2012, 10(23): 1-2.
- [6] 陈实功. 外科正宗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [7] 薛己. 外科枢要[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983: 58-59.
- [8] 韩颐. 秦学贤. 治疗动脉硬化闭塞症的经验[J]. 北京中医药, 2011, 30(2): 105-106.
- [9] 侯玉芬, 张玉冬, 程志新, 等. 补阳还五汤加减配合溶栓胶囊治疗闭塞性动脉硬化症 73 例[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(3): 425.
- [10] 张川, 柳润辉, 李慧梁, 等. 黄芪甲苷对大鼠心肌基因表达谱的影响[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2): 172-175.
- [11] 丁贺田, 朱丽华, 张庆波, 等. 黄芪甲苷对免疫功能影响的体外实验研究[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2014, 17(12): 2021-2024.
- [12] 陈梦, 赵丕文, 孙艳玲, 等. 红花及其主要成分的药理作用研究进展[J]. 环球中医药, 2012, 5(7): 556-560.
- [13] 梁宁, 韦松基, 林启云. 鸡血藤总黄酮对血虚小鼠抗贫血作用及机理研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(2): 362-363.
- [14] 孙瑞茜, 彭静, 郭健, 等. 鬼箭羽的现代药理作用研究成果[J]. 环球中医药, 2015, 8(2): 245-249.

(收稿日期: 2015-12-08)

编辑 陈瑞芳