

· 实验研究 ·

活血潜阳胶囊对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞增殖的影响 *

钱培刚¹ 周 端¹ 顾仁樾²

内容提要 目的:观察活血潜阳胶囊对血管紧张素 II(AT II)诱导的血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响。方法:贴块法行 SD 大鼠胸主动脉 VSMC 分离培养。倒置相差显微镜、透射电镜、 α -SM-actin 鉴定。以血清药理学方法进行实验,采用通法采集药物血清, 10^{-6} mol/L AT II 为刺激因子,卡托普利(Captopril)为对照,活血潜阳胶囊药物血清分为 10%、7.5%、5%、2.5% 共 4 个浓度。采用结晶紫染色法观察细胞生长曲线,测定氘标-胸腺嘧啶核苷(3 H-TdR)掺入量了解 DNA 合成的变化,并用透射电镜观察细胞超微结构的改变。结果:(1)经活血潜阳胶囊处理后,细胞增殖速度明显下降,生长曲线下移, 3 H-TdR 掺入量减少, DNA 合成明显受到抑制,其作用与 Captopril 相当,且在一定范围内有剂量依赖性。(2)活血潜阳胶囊可以改善 AT II 引起的细胞超微结构改变,使 VSMC 仍保持收缩型的特征,与 Captopril 的作用相似。结论:活血潜阳胶囊能抑制 AT II 引起的 VSMC 增生和结构改变,从细胞水平初步探讨了活血潜阳胶囊改善高血压血管重构的机理。

关键词 活血潜阳胶囊 血清药理学 血管紧张素 II 血管平滑肌细胞

Effect of Huoxue Qianyang Capsule on Cell Proliferation Induced by Angiotensin II in Cultured Smooth Vascular Muscle Cells QIAN Pei-gang, ZHOU Duan, GU Ren-yue *Longhua Hospital Affiliated to Shanghai University of TCM, Shanghai (200032)*

Objective: To observe the effect of Huoxue Qianyang Capsule (HXQYC) on cell proliferation induced by angiotensin II (AT II) in cultured rat's thoracic vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods:** VSMCs were isolated from the media of SD rat's thoracic aorta obtained by explant method, and identified by inverted phase light and transmission electron microscopic (TEM) examination and immunocytochemistry assay (α -SM-actin). The experiment was carried out with the serum pharmacological method, with the drug contained serum gathered by 3d-2t-1hr way, the AT II (10^{-6} mol/L) to induce cell proliferation, as well as Captopril as drug for positive control. The concentration of HXQYC contained serum used in the experiment was 10%, 7.5%, 5% and 2.5%. The cell growth curve was observed by crystal violet staining technique, the change of DNA synthesis was evaluated by [3 H]-thymidine incorporation method and the ultrastructure of cells was observed by TEM. **Results:** (1) After HXQYC treatment, the cell proliferation lowered significantly, the cell growth curve moved down, 3 H-TdR incorporation reduced and DNA synthesis inhibited significantly. The effect of HXQYC was equivalent to Captopril and was dose-dependent to a certain extent. (2) HXQYC could improve the AT II induced ultrastructural change of cells, and keep VSMCs in characteristics of contractive type. The effect was similar to that of Captopril. **Conclusion:** HXQYC could antagonize the proliferational and structural change of VSMCs induced by AT II. This article explores the mechanism of HXQYC in improving vascular reconstruction in hypertension from the cytological level preliminarily.

Key words Huoxue Qianyang Capsule, serum pharmacology, angiotensin II, vascular smooth muscle cells

* 上海市科委资助项目(No. 984319134)

1. 上海中医药大学 2001 级博士(上海 200032); 2. 上海中医药大学附属龙华医院

活血潜阳胶囊是上海中医药大学附属龙华医院周端、顾仁樾教授,根据名老中医吴圣农教授的临床经验

研制而成。活血潜阳胶囊的初步研究显示:它能有效降低血压,改善血液流变性、降低心肌和血液 AT II、ET-1 含量、增加血浆 NO 水平,对左心室肥厚、心肌内小血管重构有一定逆转作用^[1-3]。本研究在已有基础上,从细胞水平进一步探索活血潜阳胶囊改善血管重构的机理,开拓中医药治疗高血压病的新前景。

材料与方法

1 实验材料

1.1 实验动物 SD 大鼠,雄性,7 周,清洁级,复旦大学医学院实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 DMEM、小牛血清、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶(GIBCOBRL 公司),碱性磷酸酶标记的 α -SM-actin 单抗(Sigma, 1:100),血管紧张素 II(AT II, Sigma),结晶紫(上海远航试剂厂),氚标-胸腺嘧啶核苷(³H-TdR, 1mCi/ml, 中国科学院上海核技术开发公司)、活血潜阳胶囊(由丹参、潼蒺藜、白蒺藜、泽泻、青箱子等组成, 0.25g/粒, 龙华医院制剂室),卡托普利(Captopril, 简称 Cap; 上海施贵宝公司)。

1.3 主要仪器设备 超净台(上海净化设备厂), CO₂ 培养箱(Hetaeus), 倒置相差显微镜(上海光学仪器厂), HITACHI(日本日立公司)H-500 透射电镜, 酶标仪(μ Quant)。

2 实验方法

2.1 大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)的分离培养 采用组织贴块法^[4]。无菌条件下分离 SD 大鼠胸主动脉, 剪碎后放入含 15% 胎牛血清 DMEM 中培养。用光镜、电镜和 α -SM-actin 鉴定。选择生长良好的第 8 代 VSMC 用于实验。

2.2 活血潜阳胶囊药物血清的制备 分组:生理盐水组(空白血清组), 活血潜阳组[1.2g/(kg·d)], Captopril 组[14mg/(kg·d)]。方法:每组 Wistar 大鼠 4 只, 雄性, 200~250g, 清洁级, 上海中医药大学实验动物中心提供, 按 1ml/100g 给予灌胃, 采用通法^[5], 即每日两次, 连用 3 天, 最后一次给药 1h 后, 乙醚麻醉, 腹主动脉采血(采血前禁食不禁水 12h), 室温静置 4h, 离心, 同种条件血清混匀, 灭活、分装, -20℃ 保存。

2.3 活血潜阳胶囊药物血清对 VSMC 生长曲线的影响 采用结晶紫染色法^[6]。分组:空白组(仅加 DMEM 液);AT II 组(10% 空白血清加 10^{-6} mol/L AT II);10%活血潜阳组(10% 活血潜阳胶囊药物血清加 10^{-6} mol/L AT II);7.5%活血潜阳组(含 7.5% 活血潜阳胶囊药物血清和 2.5% 空白血清加 10^{-6} mol/L AT II, 总血清浓度仍为 10%);5%活血潜阳组;2.5%

活血潜阳组;Cap 组(10% Captopril 药物血清加 10^{-6} mol/L AT II)。

2.4 活血潜阳胶囊对 AT II 诱导的 VSMC DNA 合成的影响 采用³H-TdR 掺入法。分组:本底组(无刺激因子, 不加³H-TdR);空白组(无刺激因子, 加³H-TdR);AT II 组;10.0%、7.5%、5.0%、2.5%活血潜阳组;Cap 组。

2.5 活血潜阳胶囊对 VSMC 超微结构的影响 分组:空白组(仅加 DMEM, 无刺激因子), AT II 组(10^{-6} mol/L AT II), 10%活血潜阳组, Cap 组。实验方法:传代 VSMC 长满 80% 时, 换以无血清的 DMEM, 静止 48h 后, 按分组方法处理 24h, 固定细胞, 制作电镜标本。

2.6 统计学方法 采用 F 检验(SPSS 软件包)。

结 果

1 血管平滑肌细胞 VSMC 的鉴定 相差显微镜下, VSMC 呈梭形, 可重叠生长达多层, 高低起伏呈“峰、谷”状;透射电镜下, VSMC 胞浆内有很多与细胞纵轴平行的肌丝及致密斑、致密体; α -SM-actin 鉴定, VSMC 呈深紫色阳性染色, 成纤维细胞(AF)胞浆内基本无染色, 呈阴性反应。

2 活血潜阳胶囊药物血清对 VSMC 生长曲线的影响 见图 1。标准曲线($y = 0.005X + 0.028$, $r = 0.9964$), 细胞数与 OD 值直线关系良好。

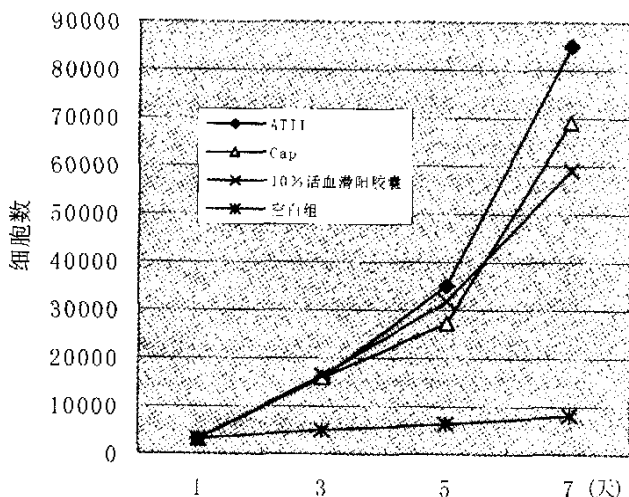


图 1 各组 VSMC 生长曲线比较

AT II 组细胞增殖活跃, 生长曲线明显上移, 显示了 AT II 的促增殖效应。从第 5 天的细胞数比较, 10%活血潜阳组、Cap 组与 AT II 组差异显著, 细胞增殖明显受到抑制;其中以 Cap 组效果最强。第 7 天, 细胞增殖受抑制的趋势更加明显, 而且 7.5%、5%、

2.5%的活血潜阳组均显示出抗增殖作用;值得注意的是,第7天10%活血潜阳组的抗增殖作用超过Cap组($P<0.01$),7.5%活血潜阳组效果与Cap组相当,且活血潜阳药物血清的作用在一定范围内有剂量依赖性。

3 活血潜阳胶囊对ATⅡ诱导的VSMC DNA合成的影响 见表1。活血潜阳各组与Cap组DNA合成明显受到抑制。10%活血潜阳胶囊作用优于Cap,7.5%、5%、2.5%活血潜阳胶囊和Cap作用相当。其中10%活血潜阳胶囊的抑制率最高,活血潜阳组抑制率呈一定剂量依赖性。

表1 各组细胞³H-TdR 掺入量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	VSMC DNA (cpm 值)	DNA 合成抑制率 (%)
本底	4	30 ± 9	
空白	4	678 ± 147	
ATⅡ	4	1999 ± 268	
10%活血潜阳	4	957 ± 144 ** △	52.13
7.5%活血潜阳	4	1274 ± 184 **	36.29
5%活血潜阳	4	1550 ± 270 **	22.46
2.5%活血潜阳	4	1629 ± 335 *	18.51
Cap	4	1340 ± 148 **	32.97

注:与ATⅡ组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与Cap组比较,△ $P<0.05$

4 活血潜阳胶囊对VSMC超微结构的影响 VSMC在ATⅡ作用下,胞浆内肌丝较空白组明显减少,而高尔基体明显增多,内质网呈扩张状态。而经活血潜阳胶囊药物血清或Captopril药物血清作用后的细胞,肌丝仍较丰富,高尔基体等细胞器未见明显增多。

5 毒理学研究结果 活血潜阳浸膏浓度为735mg/ml,给小鼠灌胃,最大胃容量0.8ml/20g体重,剂量29.4g/kg,连续7天。结果:小鼠最大耐受量的29.4g/kg,相当于生药147g/kg。观察期间小鼠饮食正常,行动敏捷,7天内无1只死亡。

讨 论

1 活血潜阳胶囊的方解 活血潜阳胶囊是导师周端、顾仁樾教授在著名老中医吴圣农教授经验方的基础上,兼顾“活血化瘀”、“平肝潜阳”两个重要环节研制而成的。

活血潜阳胶囊由丹参、潼蒺藜、白蒺藜、泽泻、青箱子等组成。方因证立,根据高血压病归属于眩晕、头痛等证,同肝阳上亢、肝肾阴虚、痰湿内停、阴阳两虚、瘀血内停等病理环节有关。尤其结合明代虞搏“血瘀致虚”,清代王清任“治眩用化瘀法”的理论,遣方用药。

方中重用丹参,丹参具有活血调血、益气安神、补血益气、宁心调肝之功。以其为君,取祛瘀通络,平肝安神之用。潼蒺藜,又名沙苑子,具有“补益肝肾,明目固精”的作用。《本草汇言》曰:“养肝明目,润泽瞳人”,常用治目暗不明,头昏目花等症。白蒺藜,具有“疏肝解郁,祛风明目,散结祛瘀”的作用。与潼蒺藜相配,一平肝以治上,一补肾以治下,二药为臣;与丹参相配,发挥活血潜阳的功效。泽泻利水渗湿,《本草纲目》曰“泽泻有养五脏,益气力,治头旋,聪明耳目之功”;佐上药以利尿降压辅养肝肾。青箱子为使,《日华子本草》曰:“益脑髓、明耳目,镇肝”。诸药相配,共奏疏利、补益、活血、安神、利湿之功;以达到降低血压,防止靶器官损害,改善患者生活质量的目的。经中药药理研究,丹参、潼蒺藜、白蒺藜、泽泻、青箱子均有明确的降压作用。

2 药物血清的采集 如何在血药峰值浓度时采血,以往报道方法各不相同。本实验采用通法⁽⁵⁾,即每天给药两次,连续3天,末次给药后1h采血。其基本理论是将中医临床传统给药方法和药物代谢动力学中有关药物半衰期理论有机地结合起来。按此法,理论上80%以上的药物成分的血药浓度可达到单次给药的峰浓度以上。

3 活血潜阳胶囊、ATⅡ和VSMC 经典的理论认为肾素-血管紧张素系统(RAS)是一个内分泌系统,但随着分子生物学进展,发现许多器官如脑、心、血管等都存在组织局部的RAS。自分泌或旁分泌的ATⅡ在局部器官生理调节和病理过程中起着更为重要的作用⁽⁷⁾。研究表明ATⅡ具有促生长激素样作用,刺激VSMC的DNA和蛋白质合成增加。本实验结果显示,经活血潜阳胶囊处理后,与单纯ATⅡ组相比,DNA合成受到抑制,细胞增殖速度明显下降,生长曲线下移,且呈剂量依赖性关系,其作用与Cap相当,说明活血潜阳胶囊对ATⅡ诱导的细胞增殖的抑制作用较肯定。

基于高血压病是一种以VSMC增殖为主要病变的疾病,近年来,VSMC两种表型之间的相互转化及增殖调控机制日益受到重视。ATⅡ能作用于VSMC上的特异受体(主要是AT₁受体),通过PLC-PKC-Ca²⁺等细胞内信息传递途径,使VSMC从收缩型向分泌型转变^(8,9)。本研究电镜观察结果表明,活血潜阳胶囊可以改善ATⅡ引起的细胞超微结构改变,使VSMC仍保持收缩型的特征,与Cap的作用相似。

活血潜阳胶囊能抑制ATⅡ引起的VSMC增生和结构改变,从细胞水平初步揭示了活血潜阳胶囊改善

高血压血管重构的机理。

参 考 文 献

1. 周 端, 符德玉, 顾仁樾. 活血潜阳胶囊治疗高血压病的临床和实验研究. 上海中医药杂志 2000;34(4):22-25.
2. 符德玉, 周 端, 顾仁樾, 等. 活血潜阳胶囊治疗高血压病(血瘀、阳亢证)临床研究. 中成药 1999;21(9):464-466.
3. 周 端, 符德玉, 顾仁樾. 活血潜阳胶囊对 SHR 心肌组织 AT II、ET 和血浆 NO 的影响. 上海中医药大学学报 1998;12(2):70-72.
4. 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养. 第 1 版(第 3 次). 西安:世界图书出版公司, 1996:68-72.

5. 李仪奎, 吴健宇. 中药血清药理实验方法给药的通法方案. 中国药理学通报 1999;(6):569-570.
6. W. Kueng, E. Silber, U. Eppenberger. Qualification of cells cultured on 96-well Plates. Anal Biochem 1989;182:16-19.
7. 程训民. 血管紧张素 II 对血管平滑肌细胞增殖的调节作用. 心血管病学进展 1998;19(5):301.
8. Gillies RJ, Didier N, Denton M. Determination of cell number in monolayer cultures. Anal Biochem 1986;159:109.
9. 汪浩川, 刘秉文, 傅明德. 天然和氧化修饰型脂蛋白对培养人动脉平滑肌细胞形态的影响. 华西医科大学学报 1995;26(2):146.

(收稿:2001-11-07 修回:2002-04-24)

· 征订启事 ·

《中国药理学报》征订启事

《中国药理学报》ACTA PHARMACOLOGICA SINICA 是中国药理学学会和中国科学院上海药物研究所主办, 科学出版社出版的全英文(附中文摘要)学术性期刊, 1980 年创刊. 本刊报道药理学及其邻近生命科学领域创新的研究成果. 本刊 2001 年入选中国期刊方阵“双高期刊”, 在 716 种进入中国期刊方阵的科技期刊中排名第 15 位. 我刊是 SCI 核心期刊, 并且进入 BA, CA, Current Contents, Excerpta Medica, Index Medicus, MEDLINE, Research Alert 等十余种著名国际检索系统. 2001 年度美国《期刊引用报告》(JCR)报告《中国药理学报》影响因子为 0.631.

本刊为铜版印刷, A4 开本, 月刊, 每期 96 页, 国内外发行. 国内定价 25.00 元/本, 全年 300 元. 国内邮发代号: 4-295, 国内统一刊号: CN31-1347/R, 国际标准刊号: ISSN1671-4083.

国外订购请联系: China Journals Service, PO Box YR7, Leeds LS9 7UU, UK. Phn + 44-113-249 7481. Fax + 44-113-2486983; E-mail: subscriptions@maney.co.uk; http://www.maney.co.uk; 编辑部地址: 上海市太原路 294 号, 上海 200031; 网址: www.chinaphar.com; 电话: 021-64742629, 021-64311833-200; 传真: 021-64742629; E-mail: aps@mail.shcnc.ac.cn

欢迎订阅 2003 年《中草药》杂志

《中草药》杂志是由国家药品监督管理局主管, 中草药信息中心站和天津药物研究院主办的国家级药理学学术刊物, 月刊, 国内外公开发行. 本刊以研究论文、简报、综述和专论等栏目集中报道我国中药基础研究、生产、检验与临床应用等方面的最新成果. 读者为高、中级药学工作者及医药卫生人员. 本刊于 1970 年 1 月创刊, 根据《中国科学引文数据库》连续 5 年来的统计数据表明, 在中国科技期刊总被引频次数前 500 名排行表中, 本刊一直名列前 18 名, 中医药类第 2 名, 中药学类第 1 名, 多年来一直入选“CA”千刊表中. 本刊为大 16 开, 每期 96 页, 定价为 14.80 元. 欢迎到邮局订阅. 国内邮发代号: 6-77; 国外代号: M221.

编辑部地址: 天津市南开区鞍山西道 308 号(300193); 电话: (022) 27474913; 传真: (022) 23006821

《深圳中西医结合杂志》征订启事

本刊的宗旨是宣传党的卫生工作政策, 坚持“双百”方针, 立足深圳、倚托港澳、面向全国、放眼世界, 重点报道中西医结合临床和科研的

新成果、新进展、新经验, 加强国内外学术交流, 促进中西医结合事业的繁荣与发展.

本刊设有专家论坛、临床论著、实验研究、学术探讨、经验交流、危急重症、疑难个案、短篇报道、中西药苑、检验诊断、学术动态、专题综述等栏目, 坚持提高与普及相结合, 理论与实际相结合, 中医与西医相结合, 临床为主, 图文并茂, 切合实用.

本刊为双月刊, 每期定价 8.00 元, 全年共计 48.00 元. 本刊邮发代号: 46-167, 订阅者可到全国各地邮局(所)办理. 本刊广告许可证: 深工商广字 0058 号. 本刊地址: 518035 深圳市笋岗西路红会医院内《深圳中西医结合杂志》编辑部; 联系电话: (0755) 83228956, 83617283

《浙江中医学院学报》2003 年征订启事

《浙江中医学院学报》为中医药综合性学术刊物, 报道中医药教学、科研、医疗的新成果、新动态、新进展, 着重理论研究和临床研究, 提倡学术创新, 开展学术争鸣, 现设有中医现代化、重点学科、专病专题、杏苑琐忆、基础研究与方法、临床研究报道、中西医结合、实验研究、针灸经络、教学改革与研究、博士论坛、中药研究、综述等栏目. 国内外公开发行, 双月刊, 单月 22 日出版, 每期定价 5.00 元, 全年定价 30.00 元. 欢迎大家踊跃投稿和到当地邮局(所)订阅, 亦可直接向本编辑部订购. 本刊国内统一刊号 CN33-1077/R, 国内邮发代号 32-14, 国际邮发代号 MB342. 本刊地址: 浙江省杭州市滨江区滨文路《浙江中医学院学报》编辑部, 邮编: 310053. 联系电话: (0571) 86613504

《湖北中医杂志》2003 年征订启事

《湖北中医杂志》(月刊)是综合性中医药科技期刊, 由湖北中医学院主办, 国内外公开发行. 本刊注重临床, 面向基层, 突出中医特色, 兼顾中西医结合. 内容充实, 切合实用. 设有论著、名医经验、专病证治、中西医结合、诊断与治法、临床报道、方药纵横、针灸骨伤、中医园地、养生护理、综述、自学辅导等栏目, 用以介绍和交流有关中医或中西医结合方面的最新成果.

本刊为月刊, 大 16 开本, 每期 56 页, 每月 10 日出版. 每册定价 4.00 元, 全年定价 48 元. 统一刊号: CN42-1189/R, ISSN1000-0704. 国内代号: 38-52, 国外代号: 0753M.

读者可在当地邮局订阅, 亦可向编辑部邮购. 地址: 武汉市武昌区云架桥 110 号(昙华林特 1 号)湖北中医学院内, 邮编: 430061; 电话: (027) 88910096