

## · 博士之窗 ·

## 淫羊藿苷对缺氧诱导血管内皮细胞损伤的保护作用

吉瑞瑞<sup>1</sup> 李付英<sup>2</sup> 张雪静<sup>2</sup> 段重高<sup>2</sup> 周亚伟<sup>1,2</sup>

**摘要** **目的** 研究淫羊藿苷(icariin, ICA)对缺氧所致血管内皮细胞(vascular endothelial cells, VECs)损伤的影响。**方法** 建立体外细胞缺氧模型,用 MTT 法观察 ICA 对缺氧损伤的血管内皮细胞活性的影响,测定细胞中丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)及乳酸脱氢酶(LDH)活力,并对细胞进行 Hoechst33342 荧光染色、电镜观察细胞超微结构,运用流式细胞仪及 DNA 琼脂糖凝胶电泳分析 DNA 断裂情况,以观察 ICA 对缺氧诱导的内皮细胞凋亡的影响。**结果** ICA 能抑制缺氧引起的血管内皮细胞的减少,降低 LDH 活力,并抑制缺氧条件下 MDA 生成,提高 SOD 活力;缺氧能诱导血管内皮细胞凋亡,表现为细胞核浓缩,沿核膜排列成块状,DNA 琼脂糖凝胶电泳显示典型“梯形条带”,流式细胞仪分析呈现典型凋亡亚二倍体峰。ICA 能显著抑制缺氧诱导的内皮细胞凋亡。**结论** ICA 具有保护缺氧诱导的血管内皮细胞损伤的作用,其作用机制与抗脂质过氧化物产生、提高 SOD 活力以及抗细胞凋亡有关。

**关键词** 淫羊藿苷;血管内皮细胞损伤;细胞凋亡;缺氧

**Effect of Icariin on Hypoxia Induced Vascular Endothelial Cells Injury** JI Rui-rui, LI Fu-ying, ZHANG Xue-jing, et al *College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing (100871)*

**Abstract** **Objective** To study the effect of icariin on vascular endothelial cells (VECs) injury induced by hypoxia. **Methods** The hypoxia-ischemia model was established. The effect of icariin on injury of VECs activity induced by hypoxia was determined by MTT assay. The levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and lactate dehydrogenase (LDH) activity in cell homogenate were measured with corresponding kit. Effect of icariin on cells apoptosis induced by hypoxia was determined by Hoechst 33342 fluorescent staining, cell ultrastructure observation under transmission electron microscopy and analysis on gene fragmentation by flow cytometry and DNA gel electrophoresis. **Results** ICA could inhibit the hypoxia induced VECs reduction, suppress LDH activity, reduce the MDA production, and enhance SOD activity under hypoxia. Hypoxia could induce VECs apoptosis, revealed chromatin condensed in nuclei with the fragments arranged along the nuclear membrane. DNA gel electrophoresis showed typical ladder strands of DNA. Cells displayed a typical sub-diploid peak in flow cytometry. ICA could significantly inhibit the hypoxia induced apoptosis of VECs. **Conclusion** ICA has the protective effect on hypoxia injured VECs, which may be related to its effect of anti-apoptosis, anti-lipid peroxidation and SOD activity enhancing.

**Key words** icariin; vascular endothelial cells injury; apoptosis; hypoxia

内皮细胞是覆衬于全身血管和淋巴管内面的单层扁平细胞,具有多种生理功能,它作为组织与血液间的第一道屏障,是最先感受缺氧的细胞之一<sup>[1,2]</sup>。在缺血性心脏病的发生发展过程中,内皮细胞受损、功能障碍是其中的关键因素<sup>[3]</sup>。缺氧损伤可引起活性氧的大量

产生。自由基、活性氧、脂质过氧化物均可引起内皮细胞损伤。缺氧还能够加速血管内皮细胞凋亡,引起血管内皮功能异常。对缺氧内皮细胞的保护将阻止内皮细胞的进一步恶化,从而达到改善症状、治疗疾病的目的<sup>[4]</sup>。淫羊藿苷(icariin, ICA)是从淫羊藿总黄酮中提取的主要单体成分。文献报道,ICA 有降低心肌耗氧量、增加冠脉流量的作用<sup>[5]</sup>,我们在前期工作中,采用不同动物、不同心肌缺血模型,多层次进行了 ICA 抗心肌缺血的药效学研究,研究结果表明,ICA 有确切的

作者单位:1. 北京大学化学与分子工程学院(北京 100871);2. 北京大学世佳研究中心

通讯作者:周亚伟, Tel: 010-62538007, E-mail: ywzhou@pku.edu.cn

抗心肌缺血作用。在此研究基础上,本研究在建立体外内皮细胞缺氧模型的基础上,研究 ICA 对缺氧所致的内皮细胞损伤的影响,从而探讨了 ICA 抗心肌缺血的作用机制。

## 材料与方法

1 材料 人脐静脉内皮细胞株 ECV-304 引自美国组织培养库(ATCC CRI-1998)。淫羊藿苷由北大世佳研究中心提供。DMEM 培养基,胰蛋白酶,四甲基偶氮唑蓝(MTT)购于美国 GIBCO 公司。胎牛血清为天津正江高科技公司产品。二甲基亚砜(DMSO)购于 Amresco 公司。RNA 酶,PI 为 Sigma 公司产品。培养细胞荧光染色凋亡显示试剂盒为北京威格拉斯有限公司产品。缺氧装置系统为法国 BioMérieux<sup>®</sup> sa 公司产品。酶标仪(Multiskan MK3)购于上海雷勃分析仪器有限公司。紫外可见分光光度计(UV-2501PC)为日本岛津公司产品。流式细胞仪为 Becton-Dickinson 公司产品。荧光显微镜为 Olympus 公司产品。

## 2 方法

2.1 内皮细胞培养 ECV-304 细胞培养于 DMEM 培养液中,其中含 10% 胎牛血清,青霉素 100 U/ml,链霉素 100  $\mu$ g/ml,37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

2.2 MTT 法检测 ICA 对血管内皮细胞毒性试验 参照文献<sup>[6]</sup>,取 ECV-304 细胞  $5 \times 10^3$ ,接种于 96 孔细胞培养板内,用 DMEM 培养液配制成不同浓度的 ICA 药液,实验时弃去细胞培养液,分别向孔中加入不同浓度的 ICA 药液 200  $\mu$ l,每个浓度组设重复孔 6 个,空白对照组每孔加入 200  $\mu$ l 不含 ICA 的 DMEM 培养液。37℃ CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72h。终止培养前每孔加入 MTT(最终浓度 0.5 mg/ml),37℃,5% CO<sub>2</sub> 孵育 4 h。弃去上清液,每孔内加入 DMSO 200  $\mu$ l,静置 10 min。在酶标仪 570 nm 下测定各孔吸光度值。

2.3 建立体外培养的内皮细胞缺氧模型 采用法国 BioMérieux<sup>®</sup> sa 公司缺氧装置系统。细胞在缺氧条件下培养 48h。血气分析表明常氧和缺氧细胞培养液中氧分压分别为 206 mmHg 和 18.3 mmHg,达到所需要的缺氧条件<sup>[7]</sup>。

2.4 实验分组 分正常细胞培养组(正常对照组),缺氧模型组,ICA 35、70、140  $\mu$ mol/L 组。

2.5 MTT 法检测 ICA 对缺氧损伤的内皮细胞活性的影响 取  $6 \times 10^3$  细胞,培养 24 h 后,将缺氧模型组细胞及 ICA 各浓度组细胞置于缺氧罐中培养 48

h。每组设 8 个重复孔。缺氧结束后,MTT 法检测各组细胞吸光度值。

2.6 MDA 含量、SOD 活力测定 参照试剂盒说明书并略作改动,0.25% 胰蛋白酶消化  $6 \times 10^5$  细胞,用 PBS 洗涤 2 次。将细胞充分裂解后离心,取 100  $\mu$ l 细胞上清按试剂盒说明操作。

2.7 LDH 活力的测定 将细胞接种于 24 孔培养板,取细胞培养上清,按试剂盒说明操作。

2.8 细胞凋亡的荧光 Hoechst33342 染色 将细胞用无血清 DMEM 洗涤 2 次。加入 Hoechst33342 染液,37℃ 孵育 10min。紫外光激发,荧光显微镜观察凋亡细胞并拍片。

2.9 透射电镜观察 收集约  $1 \times 10^7$  细胞,经 0.25% 戊二醛固定细胞团。脱水、包埋、超薄切片后透射电镜下观察。

2.10 流式细胞仪分析 参考文献<sup>[8]</sup>制备细胞样品,约收集  $1 \times 10^6$  个细胞,用 0.25% 胰酶/0.04% EDTA 消化细胞,细胞悬液洗涤 2 次,充分吹散混匀。70% 冷乙醇中 4℃ 固定过夜。离心弃去乙醇后,加入 RNase A(终浓度 50  $\mu$ g/ml),37℃ 温育 30 min,碘化丙啶(propidium iodide,PI,终浓度为 50  $\mu$ g/ml),4℃ 避光反应 30 min。300 目尼龙网膜过滤后的细胞即可用于流式细胞测试用。

2.11 DNA 琼脂糖凝胶电泳 参考文献<sup>[9]</sup>,收集  $10^7$  细胞,提取细胞总 DNA,1.5% 琼脂糖凝胶,50V 电压电泳 3h。

2.12 统计学分析 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $t$  检验进行显著性分析。

## 结 果

1 ICA 对内皮细胞的体外毒性实验研究 经 MTT 法检测,当 ICA 最高浓度为 140  $\mu$ mol/L 时,与正常对照组相比,细胞抑制率为 1.2%,表明对细胞无毒性作用,可用于后续试验。

2 ICA 对缺氧损伤的内皮细胞活性、MDA、SOD 活性、释放 LDH 的影响 见表 1。MTT 法可反应细胞存活的数目,缺氧可引起内皮细胞减少,与正常对照组比较差异有显著性( $P < 0.01$ ),ICA 能抑制缺氧引起的细胞减少,当浓度为 35  $\mu$ mol/L 时即发挥作用( $P < 0.05$ ),且随 ICA 浓度增加,细胞抑制率逐渐下降,并呈现一定的浓度依赖关系。缺氧能显著加剧细胞膜的脂质过氧化反应,与正常对照组比较,缺氧损伤的内皮细胞中 MDA 含量明显升高( $P < 0.01$ ),当 ICA 的浓度为 140  $\mu$ mol/L 时,能显著抑制缺氧引起的

表 1 ICA 对缺氧损伤的内皮细胞活性、MDA 含量、SOD 活力及释放 LDH 的影响 (x±s)

| 组 别           | n | 抑制率 (%)                 | MDA (nmol/mg·prot)      | SOD (U/mg·prot)         | LDH (U/L)                   |
|---------------|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------------------------|
| 正常对照          | 8 | 0                       | 1.07±0.21               | 25.25±3.42              | 410.50±122.22               |
| 缺氧模型          | 8 | 53.45±8.00*             | 2.56±0.38*              | 16.53±3.71*             | 1572.63±198.59*             |
| ICA 35μmol/L  | 8 | 46.16±5.47 <sup>△</sup> | 2.12±0.54               | 18.95±2.02              | 1226.39±87.24 <sup>△△</sup> |
| ICA 70μmol/L  | 8 | 41.36±2.84 <sup>△</sup> | 1.92±0.79               | 20.75±1.07 <sup>△</sup> | 809.02±129.54 <sup>△△</sup> |
| ICA 140μmol/L | 8 | 8.20±6.68 <sup>△</sup>  | 1.51±0.20 <sup>△△</sup> | 21.12±1.13 <sup>△</sup> | 694.29±218.59 <sup>△△</sup> |

注：与正常对照组比较，\* P<0.01；与缺氧模型组比较，<sup>△</sup>P<0.05，<sup>△△</sup>P<0.01

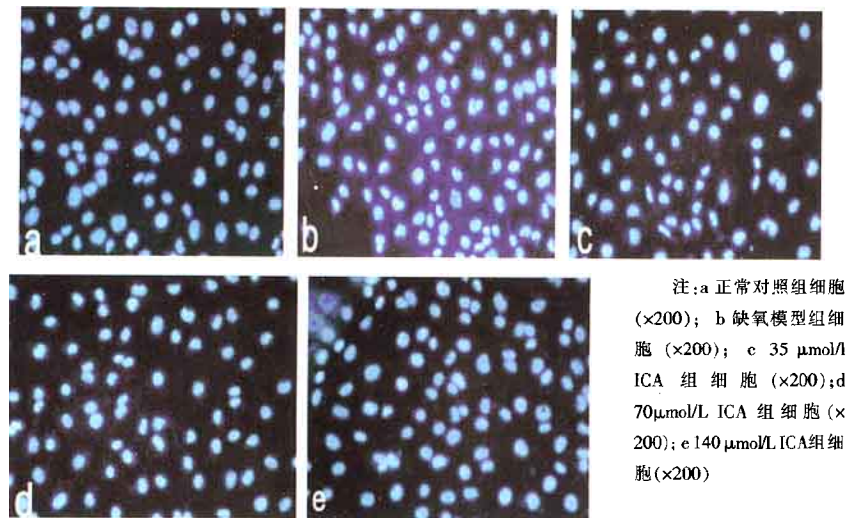


图 1 细胞核形态的 Hoechst33342 荧光染色

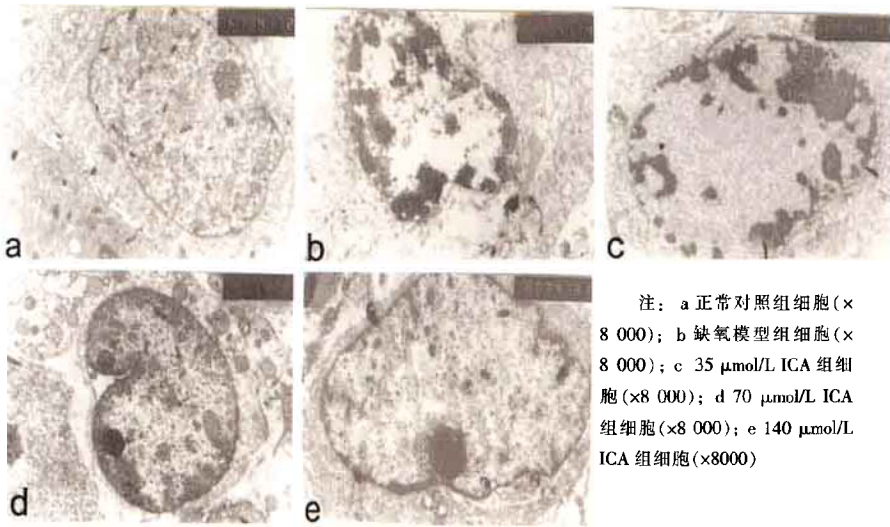


图 2 细胞核超微结构变化

MDA 升高 ( $P<0.01$ ), 35 μmol/L、70 μmol/L ICA 与缺氧模型组比较, 有下降趋势, 但经统计学分析, 差异不具有显著性。缺氧模型组细胞 SOD 活性明显下降, 与正常对照组比较, 差异有显著性 ( $P<0.01$ ), 加入不同浓度的 ICA 可剂量依赖地抑制 SOD 活性降低, 当 ICA 浓度为 70 μmol/L 时与缺氧模型组比较差异有显著性 ( $P<0.05$ ), 表明 ICA 能通过提高内在的抗氧化酶活性, 保护细胞膜免受自由基的攻击。与正常对照组比较, 缺氧模型组细胞上清中 LDH 活力明显升高, 差异具有显著性 ( $P<0.01$ )。ICA 各剂量组均能显著减少缺氧引起的 LDH 释放 ( $P<0.01$ ), 且表现出明显的剂量依赖效应。

### 3 ICA 对缺氧诱导的血管内皮细胞凋亡的影响

#### 3.1 Hoechst 33342 荧光染色观察细胞核变化

Hoechst 33342 是一种 DNA 亲和染料,能特异地与 DNA 螺旋小沟富含 AT 重复序列结合。经荧光显微镜观察,正常细胞核呈现弥散均匀的蓝色荧光(见图 1a),缺氧模型组细胞核发生染色质凝聚,核边缘化,呈现明亮的荧光,偶见有核碎裂现象,有游离的凋亡小体出现(见图 1b)。与缺氧模型组比较,随药物浓度的升高,高荧光强度的细胞逐渐减少,当 ICA 浓度为 140  $\mu\text{mol/L}$  时,部分细胞呈均匀弥散的荧光,或仅表现为核玻珠化或波纹状等早期凋亡的变化(见图 1c-e)。

**3.2 细胞核超微结构变化** 细胞核超微结构变化是凋亡细胞最富特征性的改变。正常对照组细胞核膜光滑平整,染色质分布均匀(见图 2a)。与正常对照组细胞比较,缺氧模型组细胞出现典型的凋亡形态学变化,包括染色质高度浓缩,沿核膜排列形成大小不同的块状(见图 2b)。与缺氧模型组比较,ICA 各剂量组细胞超微结构逐渐改善,以 140  $\mu\text{mol/L}$  ICA 组细胞最为明显(见图 2c-e)。

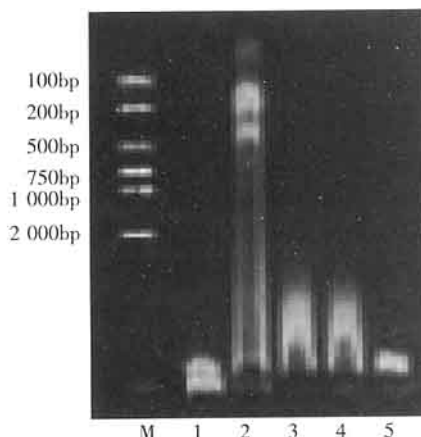
**3.3 流式细胞仪分析 ICA 对缺氧诱导内皮细胞凋亡的影响** 正常对照组细胞 DNA 大多处于  $G_0/G_1$  期,缺氧模型组细胞 DNA 在  $G_0/G_1$  前出现明显的凋亡亚二倍体峰,给予 ICA 作用的细胞凋亡峰明显降低,说明 DNA 断裂减轻。正常细胞平均凋亡率为 1.41%;缺氧模型组细胞平均凋亡率为 38.22%,与正常对照组比较差异有显著性。ICA 35、70、140  $\mu\text{mol/L}$  组细胞凋亡率分别为 13.60%、9.66% 和 4.55%,与缺氧模型组比较,差异均有显著性( $P < 0.01$ )。可见 ICA 能显著抑制由缺氧诱导的内皮细胞凋亡。

**3.4 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果** 见图 3。细胞发生凋亡时,由于内源性核酸内切酶被激活,可选择性降解核小体间 DNA,形成大小不一的 DNA 片段,在琼脂糖凝胶电泳上呈现规则的、间隔 180~200bp 的 DNA 梯带,即“DNA ladder”。缺氧模型组细胞在琼脂糖凝胶电泳上可见明显的 DNA 梯形条带,35、70  $\mu\text{mol/L}$  组细胞有不规律的 DNA 断裂,140  $\mu\text{mol/L}$  未见明显 DNA 的断裂。进一步表明,缺氧可诱导细胞出现凋亡,而 ICA 能显著抑制缺氧引起的细胞凋亡,并呈现剂量依赖性。

### 讨 论

血管内皮细胞具备多种重要生理功能,内皮功能不全可通过下列途径在冠心病的形成和发展过程中起

万方数据



注:1. 正常对照组; 2. 缺氧模型组; 3. ICA 35  $\mu\text{mol/L}$  组;  
4. ICA 70  $\mu\text{mol/L}$  组; 5. ICA 140  $\mu\text{mol/L}$  组

图 3 DNA 琼脂糖凝胶电泳检测结果

关键作用:(1)导致冠状动脉血管张力调节机能受损;(2)加速冠状动脉血管壁重塑过程;(3)促进血小板活化和聚集;(4)促进单核细胞和中性粒细胞活化<sup>[10]</sup>。由此可见,内皮功能不全和冠心病心肌缺血之间存在密切的关系,研究 ICA 对内皮细胞结构和功能的影响,将有助于深入揭示其抗心肌缺血的作用机制。

我们建立了体外内皮细胞缺氧模型,模拟体内缺血缺氧环境。有利于排除体内众多的干扰因素,可以较准确研究缺氧后内皮细胞的功能变化和调控机制。首先用 MTT 法研究了 ICA 对缺氧损伤的内皮细胞活性的影响。MTT 参与活细胞线粒体的能量代谢,活细胞内线粒体脱氢酶能将 MTT 由黄色还原为蓝色的甲胍,甲胍产量与活细胞量成正比,因此甲胍的形成量既反映了线粒体的代谢活力,又能间接反映细胞的增殖与存活情况<sup>[11]</sup>。本实验发现,缺氧使内皮细胞的甲胍形成量减少,而缺氧的同时加入 ICA 可促进甲胍的形成,说明 ICA 具有抗缺氧诱导的内皮细胞损伤的作用,可能与保护线粒体的功能有关。

缺氧促使血管内皮细胞产生自由基,氧自由基不但通过对生物膜中多价不饱和脂肪酸的过氧化作用引起细胞损伤,而且还通过脂质过氧化物分解代谢产物 MDA,促使蛋白质交联聚合反应引起细胞损伤<sup>[12,13]</sup>。我们的实验也表明,缺氧促进细胞脂质过氧化反应,增加 MDA 生成,ICA 可降低缺氧损伤的内皮细胞生成 MDA,提示 ICA 具有抗细胞过氧化反应性损伤的能力。机体在正常情况下,存在完善的抗氧化体系,如 SOD、过氧化物酶在细胞浆和线粒体内发挥重要的防御作用。缺氧导致的抗氧化酶活力下降,清除氧自由基的能力降低等均会进一步加重细胞损伤<sup>[13]</sup>。我们

的研究结果表明,ICA 可提高缺氧损伤的内皮细胞中 SOD 活力,从而保护内皮细胞免受自由基损伤。

LDH 是细胞损伤的重要标志之一。细胞缺血缺氧时细胞膜通透性增加,无氧代谢增强,因此细胞内 LDH 升高并释放到细胞培养液中。本实验结果表明,加入 ICA 后可减少 LDH 的释放。以上结果均提示 ICA 可明显减轻缺氧对血管内皮细胞的损伤。

缺氧可通过加速内皮细胞凋亡,破坏内皮细胞结构,使内皮功能受损,内皮细胞对抗细胞凋亡是维持血管完整和新生血管重建的关键<sup>[14]</sup>。更有意义的是,在心肌缺血或心肌缺血再灌注损伤中,内皮细胞凋亡要早于心肌细胞的凋亡<sup>[15]</sup>。所以内皮细胞凋亡在心肌缺血过程中有重要的病理意义。在本研究中,我们通过观察以下指标,研究了 ICA 对缺氧诱导的内皮细胞凋亡的影响。(1)荧光显微镜和透射电镜观察到典型的凋亡形态学变化,表现为细胞核染色质凝聚、沿着核膜排列,形成不同形状和大小的块状,甚至染色质逐步分裂为碎片,形成凋亡小体等。随 ICA 浓度的增加,缺氧导致的内皮细胞凋亡形态学变化逐渐得到改善。(2)通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳来检测 DNA 的降解。染色质的降解是凋亡过程中一个重要的生化标志。这个过程需要内源性核酸内切酶的激活。结果发现,缺氧可导致内皮细胞出现有规律的 DNA 断裂,在琼脂糖凝胶电泳上表现为典型的“梯形”条带。而 ICA 能抑制内皮细胞 DNA 的断裂,并呈现明显的剂量依赖关系。(3)流式细胞仪分析缺氧组细胞出现典型的凋亡亚二倍体峰,ICA 能明显减轻凋亡的程度和降低凋亡细胞的数目。以上结果均表明 ICA 有抗细胞凋亡的作用,其具体的信号传导通路还需进一步研究。

总之,本研究建立了稳定可靠的体外内皮细胞缺氧模型,在此基础上,通过观察 ICA 对缺氧诱导内皮细胞活性的影响、抗氧化损伤能力以及对缺氧导致内皮细胞凋亡的影响,研究了 ICA 对缺氧诱导的内皮细胞损伤的保护作用。为揭示 ICA 抗心肌缺血的机制提供了实验依据。

#### 参 考 文 献

- Haller H. Endothelial function. General considerations. *Drugs* 1997;53(Suppl):1—10.
- Lum H, Malik A. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol* 1996;74(7):787—800.
- 李 襄. 内皮功能障碍与冠脉疾病. *心血管病学进展* 2001; 22(1):40—43.
- Li H. Endothelial dysfunction and coronary artery disease. *Advances Cardiovasc Dis* 2001; 22(1):40—43.

- Kitazono M, Takebayashi Y, Ishitsuka K, et al. Prevention of hypoxia-induced apoptosis by the angiogenic factor thymidine phosphorylase. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253(3):797—803.
- 刘崇明,于庆海,张利民. 淫羊藿苷对心脏的影响. *中草药* 1982;13(9):30—32.
- Liu CM, Yu QH, Zhang LM. Effects of icariin on heart. *Chin Herbal Med* 1982; 13(9):30—32.
- 李珊珊,李 澎,黄启福. 脂多糖对体外人脐静脉内皮细胞分泌功能及活力的影响. *中国病理生理杂志* 2001;17(7): 658—661.
- Li SS, Li P, Huang QF. Effects of lipopolysaccharide on viability and secretion function of human umbilical vein endothelial cells. *Chin J Pathophysiol* 2001;17(7):658—661.
- 张志琳,邵国富,苏海洪. 川芎嗪对血管内皮细胞抗缺氧损伤保护作用的实验观察. *中国临床神经科学* 1998;6(8): 137—139.
- Zhang ZL, Shao GF, Su HH. Anti-hypoxic injury effect of tetramethylpyrazine on vascular endothelial cell. *Chin J Clin Neurosci* 1998; 6(3):137—139.
- Ji RR, Zhang J, Wang SW, et al. D-galactose induces replicative senescent of rat pulmonary microvascular endothelial cells. *Chin Sci Bull* 2003; 48(7):680—686.
- Weber O, Schlemmer KH, Hartmann E, et al. Inhibition of human hepatitis B virus (HBV) by a novel non-nucleosidic compound in a transgenic mouse model. *Antiviral Res* 2002; 54(2):69—78.
- 俞梦越,吴维力,高润霖. 内皮功能不全与冠心病. *心血管病学进展* 2002;23(4):193—199.
- Yu MY, Wu WL, Gao RL. Endothelium dysfunction and coronary heart disease. *Adv Cardiovasc Dis* 2002; 23(4): 193—199.
- 林 蓉,刘俊田. 槲皮素对缺氧缺糖诱导血管内皮细胞损伤的保护作用. *中国药理学通报* 2003;19(4):475—476.
- Lin R, Liu JT. Protection of vascular endothelial cells from hypoxia and lack of sugar induced by quercetin. *Chin Pharmacol Bull* 2003; 19(4):475—476.
- 张志琳,包仕尧,吴鸿飞,等. 血管内皮细胞缺氧性损伤及药物干预作用的实验观察. *江苏医药* 1998;24(11):805—807.
- Zhang ZL, Bao SR, Wu HF, et al. An experimental observation on anoxic trauma of vascular endothelial cells with or without drug interference. *Jiangsu Med J* 1998; 24(11):805—807.
- 黄起壬,何 明,李 萍,等. 油茶皂苷抗心肌缺血大鼠氧自由基和脂质过氧化作用. *中国药理学通报* 2003;19(9): 1034—1036.
- Huang QR, He M, Li P, et al. Anti-oxygen free radicals and

anti-lipoperoxidation of sasanquasaponin (SQS) to myocardial ischemic rat. Chin Pharmacol Bull 2003;19(9):1034—1036.

14 Karsan A, Harlan JM. Modulation of endothelial cells apoptosis: mechanisms pathophysiological roles. J Atheroscler Thromb 1996;3(2):375—380.

15 Scarabelli T, Stephanou A, Rayment N, et al. Apoptosis of endothelial cells precedes myocyte cell apoptosis in ischemia/reperfusion injury. Circulation 2001; 104(3): 253—256.

(收稿:2005-02-24 修回:2005-04-05)

血府逐瘀汤对肝硬化门脉血流动力学的影响

陈 明 曹泽伟

肝硬化是消化科常见疾病,门脉高压引起上消化道大出血是肝硬化患者的主要死因之一。因此控制门脉压,防止再出血是临床关注的焦点。2000 年 1 月~2003 年 12 月,我们观察了血府逐瘀汤对 15 例患者肝硬化门脉血流动力学的影响,证实具有降低门脉压、预防静脉曲张再出血的作用,现报告于下。

资料与方法

1 诊断标准 (1)纳入标准:曾有食管静脉曲张破裂出血史,经临床、实验室、影像学检查(Bus、CT)诊断为肝炎后肝硬化,内镜检查为中~重度食管静脉曲张,已有 3 个月以上未再出血。(2)排除标准:既往曾有硬化剂或套扎治疗者;行外科手术断流、分流术者;合并肝癌、肝性脑病者;有严重心、肺、肾疾病者。

2 临床资料 我院消化内科住院及部分门诊患者,经诊断为肝炎后肝硬化者 30 例,按就诊顺序随机分为两组: A 组共 15 例,男 9 例,女 6 例,年龄 36~70 岁,平均 60 岁,其中肝功能(Child 分级)A 级 2 例,B 级 9 例,C 级 4 例。B 组 15 例,男 11 例,女 4 例,年龄 37~73 岁,平均 57 岁,肝功能 A 级 1 例,B 级 9 例,C 级 5 例。经统计学处理,两组在性别、年龄和肝功能方面差异无显著性( $P>0.05$ ),具有可比性。

3 用药方法 A 组:心得安 10~20 mg,每日 3 次,口服,持续 2 周,以降低给药前基础心率 20%~25%为标准。B 组:

血府逐瘀汤(桃仁 12g 红花 9g 当归 9g 生地黄 9g 川芎 5g 赤芍 6g 牛膝 9g 桔梗 6g 柴胡 3g 枳壳 6g 甘草 3g)水煎 100ml,每天分两次口服,疗程 2 周。

4 观察指标 所有患者在给药前及疗程结束后行腹部彩超检查。检查时空腹,卧位,吸气与屏气时分别检测门静脉(PV)主干内径(D)和最大血流速度( $V_{max}$ ),脾静脉(SV)主干内径(D)和最大血流速度( $V_{max}$ ),及脾脏厚度。并按下列公式计算各静脉平均流速( $V$ )及静脉血流量( $Q$ ): $Q = (D/2)^2 \pi \times 0.57 V_{max} \times 60$ ;  $V = 0.57 V_{max}$ 。

5 统计学方法 采用  $\chi^2$  检验、 $t$  检验。

结 果

1 两组门脉系统血流动力学比较 见表 1。两组给药后,PV、SV 的血管直径均缩小,但差异无显著性;PV 和 SV 平均流速和流量均降低,差异均有显著性( $P<0.05$ )。两组给药后比较 pv、sv 血管直径、平均流速和流量差异均无显著性。

2 治疗前后脾脏厚度(cm)比较 A 组给药前脾脏厚度  $4.87 \pm 1.98$ ,给药后脾脏厚度  $3.66 \pm 1.84$ ,给药前后脾脏厚度减少差异有显著性( $P<0.05$ );B 组给药前脾脏厚度  $4.84 \pm 2.01$ ,给药后脾脏厚度  $3.68 \pm 1.92$ ,给药前后脾脏厚度减少差异有显著性( $P<0.05$ );两组给药后脾脏厚度比较差异无显著性。

表 1 治疗前后门静脉、脾静脉血流动力学变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别 | 例数 | 时间 | PV              |                    |                  | SV              |                  |                 |
|----|----|----|-----------------|--------------------|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
|    |    |    | D(cm)           | V(cm/s)            | Q(ml/min)        | D(cm)           | V(cm/s)          | Q(ml/min)       |
| A  | 15 | 治前 | $1.40 \pm 0.16$ | $17.40 \pm 5.71$   | $1883 \pm 611$   | $1.09 \pm 0.29$ | $17.1 \pm 4.1$   | $1050 \pm 330$  |
|    |    | 治后 | $1.33 \pm 0.17$ | $12.30 \pm 3.82^*$ | $1170 \pm 523^*$ | $1.01 \pm 0.27$ | $10.6 \pm 3.8^*$ | $648 \pm 381^*$ |
| B  | 15 | 治前 | $1.41 \pm 0.20$ | $18.94 \pm 5.31$   | $1799 \pm 715$   | $1.12 \pm 0.26$ | $17.9 \pm 3.7$   | $1098 \pm 348$  |
|    |    | 治后 | $1.36 \pm 0.18$ | $13.30 \pm 4.11^*$ | $1063 \pm 661^*$ | $1.03 \pm 0.25$ | $10.5 \pm 3.1^*$ | $650 \pm 398^*$ |

注:与本组治疗前比较,\*  $P<0.05$

讨 论 PV 阻力增高和高动力循环是肝硬化门脉高压症发生、发展的两个重要因素。肝硬化食管胃底静脉曲张出血病死率高,再出血危险性大。持续降低门脉压力,预防出血是肝硬化治疗的重要部分。目前已公认心得安能够有效的降低门脉压力,但约有 20%~30% 的患者服用心得安无效,且在对心功能衰竭、房室传导阻滞、支气管哮喘等患者中使用受到限制。

肝硬化患者临床上常常出现胁肋疼痛、日久不愈或急躁易怒、入夜潮热等肝郁血瘀诸症。血府逐瘀汤是王清任用以治疗

“胸中血府血瘀”所致诸证,由桃红四物汤和四逆散加桔梗、牛膝而成。具有活血化瘀而不伤血,疏肝解郁而不耗气的特点。已有多项研究证明血府逐瘀汤具有明确的抗肝纤维化作用。本研究证明,血府逐瘀汤具有降低门静脉、脾静脉血流速度、血流量,缩小门脉脾静脉内径的作用,其效果与心得安相似,但无心得安的不良反应和使用限制。

初步观察结果显示血府逐瘀汤具有降低门脉压力、预防门脉高压性食管静脉曲张出血及再出血的作用。由于研究样本少,超声在血流动力学判断中存在局限性,所得结果需进一步大样本验证。其降门脉压力的机制也有待进一步阐明。

(收稿:2004-07-16 修回:2004-11-18)

作者单位:天津南开医院消化内科(天津 300100)  
通讯作者:陈 明, Tel:022-27022268, E-mail:cmjtjnk@sina.com