

· 基础研究 ·

人参三七川芎提取物对自然衰老大鼠
血管外膜重构的干预机制王 洋¹ 雷 燕² 杨 静² 刘剑刚³

摘要 **目的** 观察自然衰老大鼠血管外膜的重构特点,并探讨人参三七川芎提取物的干预作用。**方法** 将 85 只 20 月龄的自然衰老 Wistar 大鼠按体重水平分层后随机分为衰老组、人参三七川芎醇提取物低、中、高剂量组(下称中药低、中、高剂量组)及氯沙坦对照组(Losartan 组),每组 17 只,另选 14 只 2 月龄青年 Wistar 大鼠作为青年组。中药高、中、低剂量组分别给予不同剂量的人参三七川芎醇提取物[1 493.4、746.7、373.4 mg/(kg·d)]灌胃给药,Losartan 组给予氯沙坦钾混悬液[10 mg/(kg·d)]灌胃,衰老组及青年组给予同体积蒸馏水灌胃,均每日 1 次。干预 15 周后,采用 HE 染色法观察各组大鼠胸主动脉壁形态;采用苦味酸天狼猩红染色法观测血管壁胶原种类、分布和含量;放射免疫分析法检测血浆肾素活性(plasma renin activity, PRA)、血浆血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)浓度及外膜组织 Ang II 含量;生物化学分析法检测外膜组织羟脯氨酸水平;实时荧光定量多聚酶链式反应(real-time PCR, RT-PCR)检测外膜组织血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin II receptor 1, AT₁R)、血管紧张素 II 2 型受体(angiotensin II receptor 2, AT₂R)mRNA 水平;Western blot 法检测外膜组织 AT₁R、AT₂R 蛋白表达水平。**结果** 与青年组比较,衰老组血管外膜增厚,外膜厚度/管径增高,胶原纤维堆积,Ⅰ型胶原面积增加,Ⅲ型胶原面积减少,Ⅲ型胶原/Ⅰ型胶原降低($P < 0.05$),血浆 PRA 及 Ang II 降低($P < 0.01$, $P < 0.05$),外膜组织 Ang II 及羟脯氨酸含量增高,AT₁R mRNA 及蛋白表达下调,AT₂R mRNA 及蛋白表达上调($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与衰老组比较,中药低、中、高剂量组均可改善衰老血管形态学改变;中药中、高剂量组及 Losartan 组外膜厚度/管径均减小,中药高剂量组及 Losartan 组Ⅰ型胶原面积减少,Ⅲ型胶原面积增加,Ⅲ型胶原/Ⅰ型胶原明显升高,血管外膜羟脯氨酸含量明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);中药中、高剂量及 Losartan 组外膜组织中 Ang II 水平降低($P < 0.01$, $P < 0.05$);衰老组、中药各剂量组、Losartan 组各组间 PRA 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与衰老组比较,各治疗组 AT₁R mRNA 表达均增加($P < 0.01$),中药中、高剂量组 AT₂R mRNA 表达亦增加($P < 0.05$);中药高剂量组及 Losartan 组 AT₁R 蛋白表达升高($P < 0.01$, $P < 0.05$);中药中、高剂量组 AT₂R 蛋白表达亦升高($P < 0.05$)。**结论** 衰老大鼠血管出现外膜重构,表现为外膜增厚,胶原堆积,Ⅰ型、Ⅲ型胶原比例紊乱等,其机制可能与局部肾素血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)激活有关;人参三七川芎提取物可能通过对外膜局部 Ang II、AT₁R 等多靶位的干预,改善外膜重构,进而延缓血管衰老。

关键词 血管衰老;血管外膜;人参三七川芎提取物;益气活血

Intervention Mechanism of Extracts from *Radix Ginseng*, *Radix Notoginseng* and *Rhizoma Chuanxiong* on Adventitia of Senescent Rats WANG Yang¹, LEI Yan², YANG Jing², and LIU Jiangang³ 1 General Internal Department, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053); 2 Medical Experiment Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700); 3 Institute of Cardiovascular Disease, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273976);中国中医科学院基本科研业务费自主选题项目(No. ZZ2013002)

作者单位:1. 中国中医科学院广安门医院综合科(北京 100053); 2. 中国中医科学院医学实验中心(北京 100700); 3. 中国中医科学院西苑医院中国中医科学院心血管病研究所(北京 100091)

通讯作者:雷 燕, Tel: 010-64014411, E-mail: 13651217893@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 12. 1474

Medical Sciences, Beijing (100091)

ABSTRACT **Objective** To observe the reconstruction features of adventitia in senescent rats, and to explore the intervention mechanism of Chinese herbs (CH, extracts from *Radix Ginseng*, *Radix Notoginseng*, and *Rhizoma Chuanxiong*). **Methods** Totally 85 20-month senescent rats were randomly divided into 5 groups according to body weight, i.e., the aging model group, the high dose CH group, the middle dose CH group, the low dose CH group, the Losartan group, 17 in each group. Another 14 2-month old Wistar rats were selected as a young group. Extracts of CH at the daily dose of 1493.4, 746.7, and 373.4 mg/kg were administered to rats in the 3 CH groups respectively by gastrogavage. Losartan suspension at the daily dose of 10 mg/kg was administered to rats in the Losartan group by gastrogavage. Equal volume of distilled water was administered to rats in the aging model group and the young group. All medication was performed once daily. After 15-week intervention, morphological changes of thoracic aorta were observed by HE staining. The types, distribution, and contents of vessel wall collagens were determined using picric acid picrosirius red staining. The plasma renin activity (PRA), the concentration of rennin angiotensin II (Ang II), and the content of Ang II in adventitia were detected by radioimmunoassay. The content of hydroxyproline (Hyp) was detected by biochemical analysis. mRNA contents and protein expressions of angiotensin II receptor 1 (AT₁R) and angiotensin II receptor 2 (AT₂R) were detected by real-time PCR (RT-PCR) and Western blot. **Results** Compared with the young group, thickened adventitia, increased adventitia thickness/caliber, accumulated collagen fiber, increased area of type I collagen, decreased area of type III collagen, decreased type III/I collagen area ratio ($P < 0.05$), decreased plasma PRA and Ang II ($P < 0.01$, $P < 0.05$), increased contents of Ang II and Hyp in adventitia, down-regulated mRNA and protein expressions of AT₁R, and up-regulated mRNA and protein expression of AT₂R could be seen in the aging model group ($P < 0.05$). Compared with the aging model group, morphological changes could be improved in the 3 CH groups. Adventitia thickness/caliber was reduced in middle and high dose CH groups, as well as the Losartan group. The area of type I collagen was reduced and the area of type III collagen was enlarged, type III/I collagen area ratio obviously increased, contents of adventitia Hyp was obviously lowered in the high dose CH groups and the Losartan group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Ang II levels in adventitia decreased in middle and high dose CH groups and the Losartan group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). There was no statistical difference in PAR among all groups ($P > 0.05$). Compared with the aging model group, mRNA expression of AT₁R all increased in each treatment group ($P < 0.01$); mRNA expression of AT₂R also increased in middle and high dose CH groups ($P < 0.05$). Protein expression of AT₁R increased in the high dose CH group and the Losartan group ($P < 0.01$, $P < 0.05$); protein expression of AT₂R also increased in middle and high dose CH groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Adventitia remodeling occurred in aged rats, manifested as thickened adventitia and accumulated collagens, disordered ratios of collagen I and III. Its mechanism might be possibly associated with activation of renin-angiotensin system (RAS). Extracts from *Radix Ginseng*, *Radix Notoginseng*, and *Rhizoma Chuanxiong* could improve adventitial remodeling possibly by interfering multi-targets, such as Ang II and AT₁R, thereby delaying vascular aging.

KEYWORDS vascular aging; adventitia; *Radix Ginseng* extract; extracts of ginseng, *Radix Notoginseng*, and *Rhizoma Chuanxiong*; tonifying qi and activating blood

随着经济社会的发展,医疗水平的提高,我国人口平均寿命不断提高,老龄化问题日趋严重。根据中国第六次人口普查结果统计,我国 60 岁以上的老年人口已达到 7.18 亿,达到人口总数的 13.26%,预计到 2037 年,我国老龄化人口将超过 4 亿。老龄化社会已

经来临,如何延缓衰老已成为医学界迫在眉睫的问题。“血管有多老,你就有多老”(“A man is as old as his arteries”),早在 300 多年前,有着“英国的希波克拉底”之称的医学家托马斯·西登哈姆(Thomas Sydenham, 1624—1689),简明扼要地阐述了血管

和人体衰老的关系,这一古老的理论已被现代的医学研究证据所证实。

血管衰老(vascular aging),即随增龄,血管系统发生的结构和功能的特征性改变,表现为血管僵硬增加、顺应性降低和动脉管壁增厚。研究发现,增龄导致的血管退化性改变进一步加重机体生理功能的紊乱,即使没有并存糖尿病、高血压病、吸烟等危险因素,单纯的血管衰老仍可导致机体的衰老^[1]。血管壁是一个排列有序的层状结构,肌性和弹性大中动脉的管壁自内而外依次分为内膜、中膜和外膜。血管外膜结构复杂、成分多样,不仅具有支撑和营养的作用,而且集神经—内分泌—免疫功能为一体,是血管病变重要的“参与者”,甚至“始动者”,与高血压、动脉粥样硬化、血管重构等密切相关^[2-4]。

中医药在延缓衰老方面具有丰富的理论渊源和临床经验。既往研究证实,具有益气活血作用的人参三七川芎提取物具有延缓血管内皮细胞和平滑肌细胞衰老的作用,其作用可能与肾素血管紧张素系统(renin angiotensin system, RAS)相关^[5-8]。本研究以血管外膜为切入点,通过建立自然衰老动物模型,进一步研究血管衰老的特点和机制,探讨中医药延缓血管衰老的作用。

材料与方法

1 动物 20 月龄健康雄性自然衰老 Wistar 大鼠 85 只,健康雄性青年大鼠(2 月龄)14 只,动物均为清洁级,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号:SCXK(京)2006-0009。所有动物均饲养于 SPF 级动物房。

2 药物 人参、三七、川芎醇提物(拉丁名及原产地如下:人参,*Radix Ginseng*,产地:吉林抚松镇;三七,*Radix Notoginseng*,产地:云南;川芎,*Rhizoma Chuanxiong*,产地:四川)。经中国中医科学院中药研究所黄璐琦研究员鉴定,均符合《中国药典》2005 年版标准。使用时以蒸馏水稀释成相应浓度药液;氯沙坦钾片(50 mg/片,杭州默沙东制药有限公司生产,批号:Lot No.H20030654),使用时研碎,超声溶解于蒸馏水中,制备成相应浓度混悬液。

3 试剂 羟脯氨酸测试盒(南京建成生物工程研究所);碘^[125I]血浆肾素活性放射免疫分析药盒及碘^[125I]血管紧张素 II 放射免疫分析药盒(北京华埠力特生物技术研究);PCR 引物:血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin II receptor 1, AT₁R),血管紧张素 II 2 型受体(angiotensin II receptor 2, AT₂R);AT₁R

小鼠单克隆抗体及 AT₂R 兔单克隆抗体(Abcam, UK);AT₁R 小鼠单克隆抗体(Abcam, UK, Cat No: ab9391, Lot No: GR55675-4);AT₂R 兔单克隆抗体(Abcam, UK, Cat No: ab92445, Lot No: GR20429-3)。

4 动物分组及给药 85 只 20 月龄大鼠按体重分层后,随机分为 5 组:衰老组、人参三七川芎醇提物低、中、高剂量组(下称中药低、中、高剂量组)及 Losartan 组,每组 17 只。另选取 14 只 2 月龄大鼠为青年组。中药高、中、低剂量组分别给予不同剂量的人参三七川芎醇提物[1 493.4、746.7、373.4 mg/(kg·d)],分别相当于成人用生药量的 2、1、0.5 倍,Losartan 组给予氯沙坦钾混悬液[10 mg/(kg·d)],衰老组和青年组给予同体积蒸馏水。各组均灌胃给药,每日 1 次。共干预 15 周。

5 观察指标及检测方法

5.1 胸主动脉形态学观察 给药 15 周后处死动物,开胸,轻柔分离胸主动脉降段(沿主动脉出口水平至膈肌入口处),生理盐水冲洗血管内残存血液,滤纸吸干,取主动脉出口端 0~3 mm 处血管,10%中性缓冲福尔马林溶液固定 24 h,常规脱水、透明、浸蜡、石蜡立埋,从近心端开始制作石蜡切片,片厚 5 μm,每例动脉的连续切片中随机取 6 个血管环分别进行 HE 染色和苦味酸天狼猩红染色。

HE 染色:切片依次放入二甲苯、酒精、清水中脱蜡,Harris 苏木素液染色,1%盐酸乙醇分化,返蓝,乙醇伊红染色,常规脱水、透明、中性树胶封片。倒置相差显微镜下观察血管壁形态,NIS Elements 3.2 图像分析系统测量主动脉外膜厚度及管径值。

苦味酸天狼猩红染色:切片依次放入二甲苯、酒精、清水中脱蜡,0.1%苦味酸天狼猩红染液染色,90 min 后终止染色,清水漂洗数次并常规脱水、透明、中性树胶封片。偏振光镜下观察胸主动脉外膜胶原种类及分布,NIS Elements 3.2 图像分析系统测定胶原面积。

5.2 血浆肾素活性(plasma renin activity, PRA)、血浆血管紧张素 II(Angiotensin II, Ang II)浓度及外膜组织 Ang II 浓度检测 血浆标本取自腹主动脉,1 000 r/min,离心 5 min,收集血浆。外膜标本取自取主动脉出口端 6 mm 至膈肌入口端血管,取材后以眼科弯剪小心剪去滋养小血管,玻璃分针轻柔分离血管外膜,按重量体积比(组织:生理盐水=1 g:99 mL),将组织剪碎后加 4 ℃生理盐水,匀浆机充分匀浆,制备成 1%的组织匀浆,置离心机,2 000 r/min,15 min,取上清。均采用放射免疫分析法按照试剂盒

说明测定。

5.3 外膜组织羟脯氨酸含量测定 取 0.25 mL 1% 的组织匀浆(方法同上),按试剂盒说明,采用比色法测定。

5.4 外膜组织 AT₁R、AT₂R mRNA 及蛋白表达 外膜取材方法同上,采用 RT-qPCR 法测定外膜组织 AT₁R、AT₂R mRNA 水平,以各样本的目的基因的 Ct 值 - 各个样本的管家基因(GAPDH)的 Ct 值,得到 ΔCt;用 ΔCt - 对照组的均值,得到 -ΔΔCt。采用 2^{-ΔΔCt} 计算各个样本目的基因的表达变化。采用 Western blotting 法测定 AT₁R、AT₂R 的蛋白表达,应用 IPP 软件对扫描图象的目的条带进行灰度分析,计算各个样本目的蛋白的表达变化。PCR 引物序列见表 1。

表 1 目的基因引物序列

引物名称	引物序列	引物长度(bp)
AT ₁ R	上游:5' - CATCACCATCTGCATAGCG -3'	143
	下游:5' - TCGTAGACAGGCTTGAGTGG -3'	
AT ₂ R	上游:5' - CCCTTCCATGTTCTGACCTT -3'	128
	下游:5' - ACACAGCTGTTGGTGAATCC -3'	
GAPDH	上游:5' - CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA -3'	128
	下游:5' - GGCATGGACTGTGGTCATGA -3'	

6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

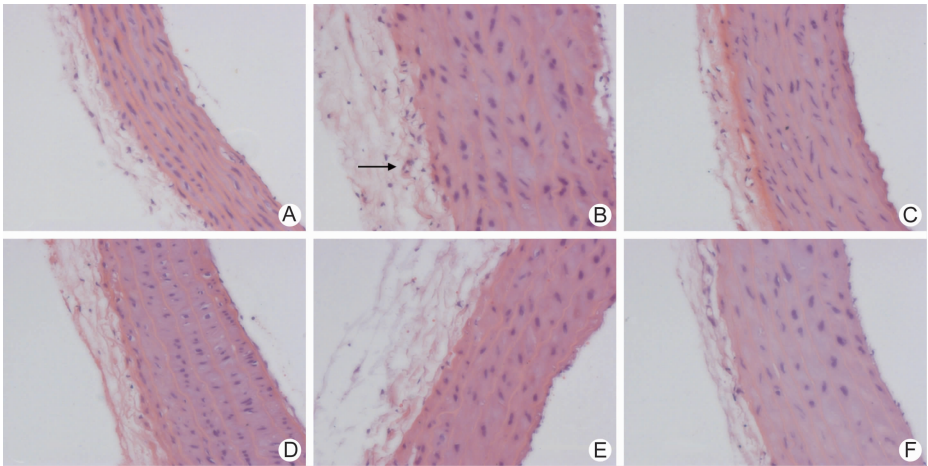
1 各组大鼠一般情况 各组大鼠体重正常,青年组大鼠毛发紧密光滑,有光泽、不易脱落,色纯白,行动活泼,反应灵敏;其余各组大鼠毛发较青年组稀疏,色黄,行动稍迟缓,尤其模型组大鼠毛发蓬松枯槁、无光泽、易脱落,色发黄,行动迟缓。各组衰老大鼠均有亡死,主要原因为灌胃及衰老导致的相关疾病。

2 各组大鼠胸主动脉形态学观察(表 2,图 1、2) HE 染色结果可见,衰老组大鼠外膜明显增厚,成纤维细胞增生,排列紊乱;中膜明显增厚,平滑肌细胞排列紊乱,各弹力纤维层严重扭曲增厚。青年组外膜较薄,结构完整,成纤维细胞数目适中,排列规则;中膜较薄,弹力纤维层排列有序,平滑肌细胞排列规则。Losartan 组外膜无明显增厚,结构完整,成纤维细胞数目适中,排列规则;中膜无明显增厚,平滑肌细胞增生不明显,细胞数目接近正常,排列较规则。中药高、中、低剂量组外膜无明显增厚,结构较完整,成纤维细胞数目适

表 2 各组血管外膜厚度、管径值及胶原面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

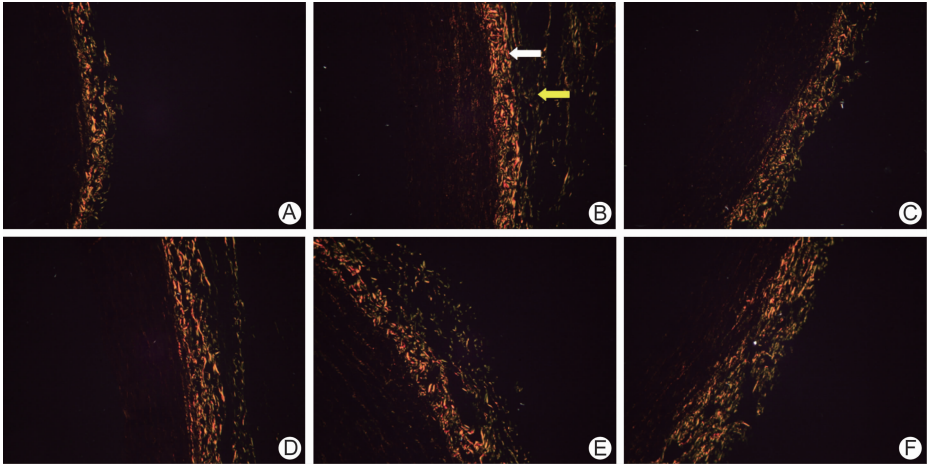
组别	<i>n</i>	外膜厚度(μm)	管径(μm)	外膜厚度/管径	I 型胶原(mm ²)	Ⅲ型胶原(mm ²)	Ⅲ型胶原/I 型胶原
青年	3	71.28 ± 12.12	814.23 ± 14.01	0.06 ± 0.00	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.98 ± 0.01
衰老	3	126.24 ± 10.32 *	1 045.54 ± 23.90 *	0.12 ± 0.01 *	0.19 ± 0.01 *	0.07 ± 0.02 *	0.45 ± 0.05 *
中药高剂量	3	80.18 ± 11.09 ^Δ	1 171.46 ± 15.22 ^Δ	0.07 ± 0.02 ^Δ	0.17 ± 0.02 ^Δ	0.15 ± 0.01 ^Δ	0.88 ± 0.03 ^{ΔΔ}
中药中剂量	3	102.59 ± 9.45 ^Δ	1 279.41 ± 16.36 ^Δ	0.08 ± 0.00 ^Δ	0.19 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.81 ± 0.04 ^Δ
中药低剂量	3	110.28 ± 8.63 ^Δ	1 199.74 ± 45.04 ^Δ	0.10 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.13 ± 0.02	0.61 ± 0.02
Losartan	3	78.37 ± 13.41	1 153.94 ± 98.33	0.07 ± 0.00 ^Δ	0.17 ± 0.01 ^Δ	0.16 ± 0.01 ^{ΔΔ}	0.96 ± 0.01 ^{ΔΔ}

注:与青年组比较,**P* < 0.05;与衰老组比较,^Δ*P* < 0.05,^{ΔΔ}*P* < 0.01



注:A 为青年组;B 为衰老组;C 为中药高剂量组;D 为中药中剂量组;E 为中药低剂量组;F 为 Losartan 组;箭头示成纤维细胞增生,排列紊乱

图 1 各组大鼠胸主动脉形态 (HE 染色, ×200)



注:A 为青年组;B 为衰老组;C 为中药高剂量组;D 为中药中剂量组;E 为中药低剂量组;F 为 Losartan 组;白色箭头示 I 型胶原;黄色箭头示 III 型胶原

图 2 各组大鼠胸主动脉胶原分布(苦味酸天狼猩红染色,×200)

中,排列较规则;中膜无明显增厚,平滑肌细胞增生不明显,细胞数目接近正常,排列较规则。采用图像分析系统测量各组外膜厚度、管径,结果显示,与青年组比较,衰老组外膜厚度、管径及外膜厚度/管径比值增加($P<0.05$);与模型组比较,中药高、中剂量组外膜厚度、管径、外膜厚度/管径值比值均减小($P<0.05$),中药低剂量组外膜厚度、管径增加($P<0.05$),但外膜厚度管径比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

苦味酸天狼猩红染色结果可见,大鼠胸主动脉壁胶原分布有以下特点:(1)胶原主要分布于血管外膜,大部分为 I、III 型胶原, I 型胶原纤维紧密排列,显示强的双折光性,呈红色或橙红色斑点或条纹; III 型胶原纤维疏网状,显示弱双折光性,呈绿色斑点或条纹;(2)相对于青年组,衰老大鼠外膜的胶原分布趋于致密。采用图像分析系统对胶原的分布面积及其比例进行分析,结果显示:与青年组比较,衰老组 I 型胶原面积增加, III 型胶原面积减少, III 型胶原面积/ I 型胶原面积下降($P<0.05$);与衰老组比较,中药高剂量组和 Losartan 组 I 型胶原面积减少, III 型胶原面积、 III 型胶原面积/ I 型胶原面积升高,差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。

3 各组大鼠血浆 PRA、血浆、血管外膜 Ang II 含量及羟脯氨酸含量比较(表 3、4) 与青年组比较,衰老组血浆 PRA 水平降低($P<0.01$);衰老组、中药各剂量组及 Losartan 组间 PRA 比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与青年组比较,衰老组血浆 Ang II 浓度减低($P<0.05$);与衰老组比较,中药高、中剂量组及 Losartan 组血浆 Ang II 浓度增高($P<0.05$, $P<0.01$);中药低剂量组 Ang II 浓度虽增高,但与衰老组

比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

与青年组比较,衰老组血管外膜组织 Ang II 及羟脯氨酸含量明显升高($P<0.01$)。与衰老组比较,中药高、中剂量组和 Losartan 组外膜组织 Ang II 含量明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。中药高剂量及 Losartan 组羟脯氨酸含量明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 3 各组血浆 PRA 及 Ang II 浓度比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PRA (ng/mL)	Ang II (pg/mL)
青年	14	9.42 ± 2.55	286.75 ± 123.57
衰老	9	6.81 ± 3.26 **	124.16 ± 95.43 *
中药高剂量	8	6.92 ± 1.98	323.36 ± 173.07 $\Delta\Delta$
中药中剂量	9	6.13 ± 3.42	291.15 ± 116.75 Δ
中药低剂量	11	5.25 ± 1.25	146.70 ± 130.88
Losartan	10	6.17 ± 1.43	482.71 ± 191.35 $\Delta\Delta$

注:与青年组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与衰老组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

表 4 各组血管外膜 Ang II 含量及羟脯氨酸含量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Ang II ($\mu\text{g/g pro}$)	羟脯氨酸含量 ($\mu\text{g/g 组织}$)
青年	5	391.27 ± 72.83	24.10 ± 8.52
衰老	5	601.24 ± 201.35 **	63.86 ± 6.87 **
中药高剂量	5	389.86 ± 59.04 $\Delta\Delta$	39.76 ± 10.08 Δ
中药中剂量	5	407.13 ± 124.40 Δ	54.22 ± 21.30
中药低剂量	5	499.08 ± 65.15	56.63 ± 25.06
Losartan	5	292.46 ± 61.65 $\Delta\Delta$	33.73 ± 12.49 $\Delta\Delta$

注:与青年组比较, * $P<0.01$;与衰老组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

4 各组大鼠血管外膜 AT₁R、AT₂R mRNA 表达水平比较(表 5) 与青年组比较,衰老组 AT₁R mRNA 水平降低, AT₂R mRNA 水平增加(均 $P<0.01$);与衰老组比较,中药各剂量组及 Losartan 组

AT₁R mRNA 水平增高($P < 0.01$)。中药高、中剂量组 AT₂R mRNA 水平亦增加($P < 0.01$, $P < 0.05$)；中药低剂量组和 Losartan 组 AT₂R mRNA 水平与衰老组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 5 各组大鼠血管外膜 AT₁R、AT₂R mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AT ₁ R	AT ₂ R
青年	5	1.25 ± 0.16	1.24 ± 0.19
衰老	5	0.32 ± 0.03 *	2.97 ± 0.18 *
中药高剂量	5	0.82 ± 0.10 $\Delta\Delta$	3.43 ± 0.23 Δ
中药中剂量	5	0.71 ± 0.06 $\Delta\Delta$	3.13 ± 0.42 Δ
中药低剂量	5	0.57 ± 0.04 $\Delta\Delta$	2.81 ± 0.29
Losartan	5	1.05 ± 0.09 $\Delta\Delta$	2.77 ± 0.36

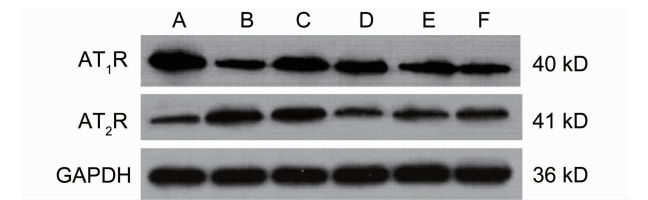
注:与青年组比较,* $P < 0.01$;与衰老组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

5 各组大鼠血管外膜 AT₁R、AT₂R 蛋白表达水平比较(表 6,图 3) 与青年组比较,衰老组 AT₁R 蛋白表达量降低,AT₂R 蛋白表达量升高(均 $P < 0.01$)；与衰老组比较,中药高剂量组及 Losartan 组 AT₁R 蛋白表达水平增高($P < 0.05$, $P < 0.01$),中药高、中剂量组 AT₂R 蛋白表达量明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 6 各组大鼠血管外膜 AT₁R、AT₂R 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AT ₁ R 蛋白	AT ₂ R 蛋白
青年	5	1.11 ± 0.23	0.15 ± 0.03
衰老	5	0.38 ± 0.06 *	0.67 ± 0.20 *
中药高剂量	5	0.58 ± 0.08 Δ	0.97 ± 0.03 Δ
中药中剂量	5	0.53 ± 0.08	0.82 ± 0.04 Δ
中药低剂量	5	0.48 ± 0.09	0.61 ± 0.02
Losartan	5	0.78 ± 0.12 $\Delta\Delta$	0.64 ± 0.19

注:与青年组比较,* $P < 0.01$;与衰老组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$



注:A 为青年组;B 为衰老组;C 为 Losartan 组;D 为中药高剂量组;E 为中药中剂量组;F 为中药低剂量组

图 3 各组大鼠血管外膜 AT₁R、AT₂R 蛋白表达电泳图

讨 论

本研究结果表明,衰老大鼠血管外膜出现形态和结构成分的双重重构,人参三七川芎提取物具有改善外膜重构的作用。血管重构又称血管重塑、重建,是机体在生长、发育、衰老和疾病过程中,血管为适应体内

外环境变化而发生的结构和功能的改变,是细胞增殖、坏死、迁移及细胞外基质合成、降解所致的动态性血管构型变化过程,它不仅是高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病共同的病理生理改变,而且是靶器官损害的重要发病机制之一^[9,10]。近来,外膜在血管重构中的作用得到极大关注,其原因为:(1)多种病理因素均能引起血管外膜重构^[11-13];(2)外膜对损伤因素的反应最为灵敏,先于血管中膜和内膜,不仅是血管重构的重要参与者,还可能是介导中膜和内膜病变的始动因素和“主导者”,是血管损伤的“导火索”^[14]。本实验结果发现,衰老血管外膜出现组织形态学改变,即外膜重构,表现为外膜明显增厚,成纤维细胞增生,排列紊乱,各弹力纤维层严重扭曲增厚,外膜厚度、外膜厚度/管径显著增大,外膜胶原分布致密,胶原纤维堆积,粗大,排列紊乱。而中药各剂量组外膜无明显增厚,结构较完整,成纤维细胞数目减少,排列较规则,纤维形态较纤细,排列有序。中药高、中剂量组外膜厚度、管径值、外膜厚度/管径比值明显小于模型组,提示人参三七川芎提取物能改善衰老血管外膜重构,进而延缓血管衰老。

血管重构既强调血管在几何意义上的重构,也重视结构成分的变化,因后者是前者的病理基础^[15,16]。胶原是细胞外基质主要成分,I 型和 III 型胶原是血管胶原的主要类型^[17],其中 I 型胶原起支架作用,与血管壁的强度有关,III 型胶原决定胶原纤维的弹性,与血管的可扩张性有关^[17,18]。胶原总量和 I/III 型胶原比值的改变均可影响血管的生物物理特性。研究发现,胶原(主要是 I 型胶原)合成紊乱是血管重构的核心事件之一^[19,20]。本实验结果发现:衰老大鼠血管外膜的胶原总量和 I、III 型胶原比例出现变化,具体表现在:(1)胶原的分布趋于致密;(2)总胶原含量明显增高;(3)I 型胶原增加,III 型胶原减少,III 型胶原/I 型胶原降低。中药高剂量组和氨沙坦钾组血管外膜胶原总量明显降低,I 型胶原减少,III 型胶原增加,III 型胶原/I 型胶原升高,III 型胶原/I 型胶原接近于青年组。羟脯氨酸在胶原蛋白中含量达 13.4%,弹性蛋白中含少量,其他蛋白中不存在。本研究结果提示衰老组羟脯氨酸含量增高,间接反映衰老大鼠血管外膜胶原含量增高,高剂量中药和氨沙坦钾具有抑制衰老大鼠血管外膜胶原增生的作用。已有实验证明,氨沙坦钾具有抑制外膜胶原表达的作用,本实验结果进一步说明了高剂量人参三七川芎提取物具有与氨沙坦钾类似的减轻胶原增生,逆转胶原比例紊乱,从细胞外基质层面改善外膜重构的作用。

血管外膜局部 RAS 激活是衰老血管外膜重构的原因之一,人参三七川芎提取物通过干预 RAS 改善外膜重构,延缓血管衰老。RAS 在血管衰老的病理进程中具有重要的地位。就血液循环中的 RAS 而言,随着年龄的增长,肾小球近球细胞器机能减退,对于肾素的合成和分泌功能减弱,且交感神经紧张性降低,肾素分泌量也随之减少,二者共同作用,导致血浆中血管紧张素含量降低,且降低幅度与年龄成正比。但是老化过程可影响到下丘脑—垂体,通过促肾上腺皮质激素、加压素、抗利尿激素等直接作用于血管,引起血压升高^[21]。就局部 RAS 而言,研究发现,老龄鼠及非人类灵长类主动脉血管的血管紧张素转换酶活性和 Ang II 浓度随年龄增加而增加^[22]。局部增长的 Ang II 作为一种细胞生长因子,通过活化相关的物质,参与包括血管细胞的增殖、凋亡、炎症反应及细胞外基质重建等病理生理过程^[23]。本实验结果发现:(1)衰老大鼠血浆 PRA 和 Ang II 浓度低于青年组,说明随着年龄的增长,肾素—血管紧张素分泌减少,整体 RAS 活性随年龄的增长而减弱,与文献报道一致^[24],与人类 RAS 随年龄改变情况一致^[25];(2)与青年组大鼠比较,衰老大鼠外膜 Ang II 含量升高,AT₁R mRNA 及蛋白表达降低,AT₂R mRNA 及蛋白表达升高,提示增龄导致的外膜局部 Ang II 升高可能是血管衰老外膜重构的原因之一,而 AT₁R 表达下调和 AT₂R 表达上调可能是机体的保护性反应,以此拮抗 Ang II 升高对血管壁的不良效应。参考 Ang II 对血管组织的作用和衰老血管的形态学改变结果,说明局部的 RAS 促进血管衰老的作用更具意义。

实验中,笔者发现了一个有趣的现象,与衰老组比较,中药组血浆 Ang II 浓度升高,而外膜局部 Ang II 浓度降低,AT₁R mRNA 及蛋白表达增加。其可能的原因:中药在受体水平上阻滞 Ang II,机体为平衡 Ang II 效应的减弱,反馈性地引起整体 RAS 活性增高,导致血浆 Ang II 升高和血管壁 AT₁R mRNA 及蛋白表达增高,且此结果与本实验 Losartan 组和文献中氨沙坦钾的干预结果一致^[26,27],说明人参三七川芎提取物有类似 AT₁R 阻滞剂的作用,可通过对 AT₁R 的干预改善血管外膜重构,延缓血管衰老。

此外,本研究还发现,与衰老组比较,中药组外膜 AT₂R mRNA 及蛋白表达增高,而氨沙坦钾组则无显著变化。既往研究已证实 AT₂R 与 AT₁R 相拮抗,具有抑制细胞生长、促进凋亡等作用^[28],局部 Ang II 升高时,AT₂R 保护性地表达上调,提示人参三七川芎提取物可能具有顺应机体保护机制的作用,通过提高

AT₂R mRNA 及蛋白表达,抑制血管外膜成纤维细胞过度增殖,干预改善血管外膜重构,进而延缓血管衰老。

中医学对于衰老的认识源远流长,《黄帝内经》中就对“女子七七,男子八八”的经典描述。在此基础上,历代医家从不同角度对衰老进行了探讨,形成了种类繁多的理论体系,气虚血瘀学说即是其中之一。中医学认为,气血是构成机体的基本物质,是维持生命活动的基础。脏腑经络、四肢百骸的一切生理活动都离不开气血。《素问·生气通天论》曰:“气血以流,长有天命。”可见,气血充盈,运行通畅是机体健康长寿的重要因素。而气血虚衰,血脉不通则是衰老的危险因素,如《灵枢·天年篇》曰:“血气虚,脉不通,真邪相攻,乱而相引,故中寿而尽也”,认为机体气血旺盛,循环不息则健康长寿,反之则早夭。人到中年以后,机体开始步入衰老阶段,出现“阳明脉衰”、“肾气衰”、“五脏皆衰”等生理病理变化,此时或外感六淫,或内伤七情,或饮食劳倦,或虚衰久病,皆亦耗气伤血。气为血之帅,气虚则无力推动血行,血为气之母,血虚则不能化气。二者相互影响,导致气虚血衰,运行不畅,终致气虚血瘀之证,进而加速机体衰老进程。现代医学研究也证实血瘀与年龄的相关性,进一步明确了气虚血瘀病机在衰老中的地位^[29,30]。临床经验也发现,老年人多虚多瘀,益气活血为临床常用的治疗原则之一^[31]。人参、三七、川芎组方具有益气活血、延缓衰老的作用,其中黄芪味甘性温,善补肺、脾之气;三七与人参同属刺五加科植物,其味甘性温,具有活血而不出血,止血而不留瘀之效,其有效成分三七皂甙具有良好的抗氧化功能;川芎辛温,活血化瘀,旁通络脉,为血中之气药,是多种活血方剂的重要组成部分,临床使用本方治疗老年患者冠心病、高血压病等血管损伤性疾病证属气虚血瘀者,均取得良好疗效。既往研究发现,本方具有良好的抗氧化作用^[8],为临床运用提供了理论支持。

综上所述,衰老血管出现外膜重构,其可能机制为外膜局部 Ang II 含量增高,激活 RAS 所致。益气活血中药人参三七川芎提取物可能通过对外膜局部 Ang II、AT₁R、AT₂R 等多靶位的干预,抑制胶原增生,胶原比例紊乱状态,从而改善衰老血管的外膜重构,延缓血管衰老。本研究为临床运用益气活血中药干预血管衰老提供了新的证据,为中医药延缓血管衰老提供了新的研究思路。延缓衰老是人类孜孜以求的梦想,衰老假说众多,如血管衰老是否通过特定途径导致机体衰老,外膜在导致血管衰老中的地位如何,中医药干预血管衰老的远期预后尚待进一步探讨和研究。

参 考 文 献

- [1] Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, et al. Mechanisms of vascular aging: new perspectives[J]. *J Gerontol Biol Sci Med Sci*, 2010, 65(10): 1028–1041.
- [2] Mounir J, Haurani A, Patrick J. Adventitial fibroblast reactive oxygen species as autocrine and paracrine mediators of remodeling: Bellwether for vascular disease[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(4): 679–689.
- [3] Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, et al. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant[J]. *Circ Res*, 2001, 89(2): 1111–1121.
- [4] Dzau VJ, Braun-Dullaeus RC, Sedding DG. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies[J]. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1249–1256.
- [5] 杨静, 雷燕, 方素萍, 等. 人参三七川芎提取物延缓血管紧张素 II 诱导内皮细胞衰老机制的研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(6): 524–528.
- [6] 杨静, 雷燕, 崔巍, 等. 人参三七川芎提取物延缓内皮细胞复制性衰老的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(12): 1544–1548.
- [7] 陶丽丽, 雷燕. 人参、三七、川芎提取物对血管平滑肌细胞衰老相关 β 半乳糖苷酶及 p16-cyclinD/CDK-Rb 通路的影响[J]. *中西医结合学报*, 2012, 20(1): 76–84.
- [8] 雷燕, 杨静, 赵浩, 等. 人参三七川芎提取物延缓衰老小鼠血管老化的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(9): 946–951.
- [9] 冯利, 张继东. 高血压血管外膜重构机制及药物干预研究进展[J]. *山东医药*, 2009, 49(47): 114–116.
- [10] 黄鑫涛, 洪华山. 肾内小动脉重构的研究现状[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2007, 12(4): 371–375.
- [11] 郭雪峰, 张继东, 姜红, 等. 芩丹胶囊对老年自发性高血压大鼠血管外膜 I、III 型胶原表达的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2010, 30(11): 1178–1182.
- [12] Schulze-Bauer CA, Regitnig P, Holzapfel GA. Mechanics of the human femoral adventitia including the high-pressure response[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282(6): H2427–H2440.
- [13] Duarte J, Perez-Palencia R, Vargas F, et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats[J]. *Br J Pharmacol*, 2001, 133(1): 117–124.
- [14] McGrath JC, Deighan C, Briones AM, et al. New aspects of vascular remodeling: the involvement of all vascular cell types[J]. *Exp Physiol*, 2005, 90(4): 469–475.
- [15] Kuzuya M, Iguehi A. Role of matrix metalloproteinases in vascular remodeling[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2003, 10(5): 275–282.
- [16] 温进坤. 血管重塑的细胞与分子机制及研究进展[J]. *河北医药*, 2002, 24(5): 331–332.
- [17] Barnes MJ. Collagens in atherosclerosis[J]. *Coll Rel Res*, 1985, 5(1): 65–97.
- [18] Strauss BH, Chisholm RJ, Keely FW, et al. Extracellular matrix remodeling after balloon angioplasty in a rabbit model of restenosis[J]. *Circ Res*, 1994, 75(4): 650–658.
- [19] Tozzi CA, Thakker-Varia S, Yu SY, et al. Mast cell collagenase correlates with regression of pulmonary vascular remodeling in the rat[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1998, 18(4): 497–510.
- [20] 孙宁, 陈连凤, 朱文玲. 血管紧张素 II 促进血管平滑肌细胞胶原合成以及其 AT₂ 受体在其中的作用[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, 32(2): 474–475.
- [21] 哈丽达, 徐新娟. 年龄与肾素-血管紧张素-醛固酮系统及血压的研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2009, 30(S1): 47–50.
- [22] Minamino T, Miyauchi H, Yoshida T, et al. Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomere in endothelial dysfunction[J]. *J Cardiol*, 2003, 41(1): 39–40.
- [23] 孙琪, 戚国庆, 符云峰, 等. 血管紧张素 II 在血管疾病中的作用[J]. *中国急救医学*, 2003, 23(3): 163–165.
- [24] 赵兴胜, 白大芳, 郑兵, 等. 老年大鼠血浆肾素-血管紧张素-醛固酮系统的改变及对盐负荷的效应[J]. *佳木斯医学院学报*, 1990, 13(3): 19–21.
- [25] 耿新军, 高耀青, 余敏娟, 等. 高血压病不同分级和不同年龄中肾素-血管紧张素 II-醛固酮活性的相关性研究[J]. *陕西医学杂志*, 2011, 8(40): 23–25.
- [26] 李虹, 白小涓, 刘强, 等. 血管紧张素 II 和 NADPH 氧化酶与血管衰老的相关性研究[J]. *中国老年学杂志*, 2006, 26(4): 493–496.
- [27] Mizuno K, Tani M, Hashimoto S, et al. Effects of losartan, a nonpeptides angiotensin II receptor antagonist, on cardiac hypertrophy and the tissue angiotensin II content in SHR[J]. *Life Sci*, 1992, 51(5): 367–374.
- [28] 陈祥新, 傅国胜. 血管紧张素 II 及其受体与血管内皮功能的关系[J]. *临床心血管病杂志*, 2003, 19(11): 698–700.
- [29] 傅梓芸. 益气活血法治疗老年病及抗衰老研究[J]. *江西中医学院学报*, 1998, 10(2): 85–86.
- [30] 钟毅, 孙立, 朱秉匡. 脾肾两虚夹瘀夹痰理论与衰老机理探讨[J]. *中医杂志*, 2000, 41(6): 325–328.
- [31] 陈可冀. 人类寿命与慢性病中医药防治策略思考[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(8): 901–902.

(收稿:2014-10-18 修回:2015-08-04)