

ASO 血瘀证血清对血管内皮细胞损伤的影响及桃红四物汤的调节作用

李 鑫¹ 李大勇¹ 陈文娜² 张 扬¹ 刘宝清¹ 李世征¹ 侯俊杰¹

摘要 **目的** 探讨动脉硬化闭塞症(arteriosclerosis obliterans, ASO)血瘀证血清对血管内皮细胞损伤的影响及桃红四物汤的调节作用。**方法** 建立脐静脉内皮细胞培养体系,制成 ASO 血瘀证血清内皮细胞损伤模型,分别加入桃红四物汤低、中、高浓度大鼠含药血清,MTT 法观察内皮细胞增殖活性,透射电镜观察内皮细胞超微结构,激光共聚焦显微镜观察细胞内钙离子浓度和细胞骨架的变化,酶联免疫吸附(ELISA)观察各组内皮细胞培养液上清中内皮素(ET)、一氧化氮(NO)和转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) 的含量。**结果** ASO 血瘀证血清组内皮细胞增殖活性下降,细胞结构破坏明显,钙离子浓度升高,培养液中 ET、NO 及 TGF- β_1 含量明显升高 ($P < 0.01$), ET/NO 比例失衡。与桃红四物汤含药血清共孵育后,内皮细胞增殖活性和细胞结构的损伤明显改善, ET、NO 及 TGF- β_1 水平下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), ET/NO 比例趋于正常。**结论** 桃红四物汤治疗血瘀证 ASO 的主要机制为改善血管内皮细胞的损伤和分泌功能失调。

关键词 动脉硬化闭塞症;血瘀证;内皮细胞;桃红四物汤;血清药理学

Effect of ASO Blood Stasis Syndrome Serum on Vascular Endothelial Cell Injury and Regulation of Taohong Siwu Decoction on It LI Xin¹, LI Da-yong¹, CHEN Wen-na², ZHANG Yang¹, LIU Bao-qing¹, LI Shi-zheng¹, and HOU Jun-jie¹ 1 Department of Vascular Surgery, Affiliated Hospital, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110032); 2 Teaching and Experiment Center, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110032)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of arteriosclerosis obliterans (ASO) blood stasis syndrome (BSS) serum on vascular endothelial cell injury and to study the regulation of Taohong Siwu Decoction (TSD) on it. **Methods** Umbilical vein endothelial cell culture system was established. The serum endothelial cell injury model with ASO BSS was prepared. Low, medium, and high concentrations TSD containing serums were respectively added. The endothelial cell proliferation activity was observed by MTT method. Ultrastructures of endothelial cells were observed under transmission electron microscope. Changes of intracellular calcium ion concentration and the cytoskeleton were observed under laser confocal microscope. Contents of ET, NO, and transforming growth factor beta₁ (TGF- β_1) in endothelial cell culture supernatant were detected by ELISA. **Results** In ASO BSS serum group endothelial cell proliferation activities decreased, the cell structure was obviously destroyed, calcium ion concentration increased, contents of ET, NO and TGF- β_1 increased significantly ($P < 0.01$), and ET/NO ratio was imbalanced. After incubating with TSD drug containing serum, endothelial cell proliferation activities and injured cell structures were obviously improved; ET, NO and TGF- β_1 levels decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), ET/NO ratios approximated to the normal level. **Conclusion** The main mechanism of TSD for treating ASO ASS lied in improving injured vascular endothelial cells and endocrine disorder.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81173273);辽宁省自然科学基金资助项目(No.201202154);辽宁省高等学校优秀人才支持计划(No.LJQ2012083);沈阳市科学技术项目(No.F12-277-1-73)

作者单位:1.辽宁中医药大学附属医院血管外科(沈阳 110032);2.辽宁中医药大学教学实验中心(沈阳 110032)

通讯作者:李大勇, Tel:024-31961230, E-mail: sylidy@aliyun.com.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2015.11.1373

KEYWORDS arteriosclerosis obliterans; blood stasis syndrome; endothelial cell; Taohong Siwu Decoction; seropharmacology

动脉硬化闭塞症(arteriosclerosis obliterans, ASO)与冠心病、缺血性中风有着共同的发病机制——动脉粥样硬化,是在脂质代谢异常、血流动力学损伤、遗传、感染、物理化学等多种损伤刺激下启动的,多种炎症因子及相关细胞因子网络交叉作用于血管壁,内皮细胞损伤和分泌功能失调应是早期的病理过程^[1],活血化瘀中药对此具有良好的治疗作用^[2,3]。本实验建立了内皮细胞培养系统,并制成 ASO 血瘀证血清内皮细胞损伤模型,观察桃红四物汤对血管内皮细胞损伤和分泌功能的调节作用。

材料与方法

1 材料

1.1 实验动物 选用健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 15 只,体重(200 ± 20) g,购自辽宁中医药大学实验动物中心,实验动物质量合格证号[SCXK(辽)2010-0001],实验过程中对动物处置方法符合动物伦理要求(中华人民共和国科学技术部,关于善待实验动物的指导性意见,2006-09-30)。

1.2 细胞来源 人脐静脉内皮细胞系 ECV-304,购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.3 药物 按桃红四物汤原方的组方比例,并根据体表面积比率^[4]折算出 200 g 大鼠的等效用药剂量作为中浓度组,另取其 1/2 剂量和 2 倍剂量作为低浓度和高浓度组,计算出水煎剂的终浓度。原方剂量为 55 g,大鼠与人体表面积比率为 0.018,55 g × 0.018 = 0.99 g,故桃红四物汤组的终浓度为:0.5 g 生药/mL、1.0 g 生药/mL、2.0 g 生药/mL。中药饮片购自辽宁中医药大学附属医院药剂中心,由专业药师进行饮片的鉴定及制剂,纯净水煎 3 次,时间分别为 1.5、1 h 及 45 min,合并煎煮液后过滤并浓缩至预定浓度,4 °C 冰箱保存。

1.4 主要试剂、仪器 内皮素(ET)、一氧化氮(NO)及转化生长因子 β₁(TGF-β₁)酶联免疫吸附双抗体,上海跃研生物技术有限公司;夹心法检测试剂盒、异硫氰酸荧光素标记的鬼笔环肽,美国 Sigma 公司;Fluo-3/AM,美国 Bio-Rad 公司产品;HH · B11 · 500 电热恒温培养箱,上海医疗器械公司;微量移液器,美国 Thermo 公司;Anthos2010 酶标仪,奥地利 Anthos 公司;JEM-1200EX 透射电镜,日本电子株式会社;激光共聚焦扫描显微镜,德国 Leica 公司。

2 方法

2.1 内皮细胞培养体系建立 内皮细胞用含 15% 胎牛血清(FBS)的 DMEM-high 培养液培养,3 天传代 1 次,传代时,先用 PBS 洗 3 遍,加入 2.5% 胰酶 1 mL 消化 2 ~ 3 min,加上述已配好的完全培养液重悬,分瓶,正常培养时每次可 1 传 3。

2.2 ASO 血瘀证血清制备 选取 10 例 ASO 血瘀证住院患者,ASO 诊断标准参照《外科学·动脉硬化闭塞症》^[5],均经临床症状、专科检查、下肢动脉多普勒超声或动脉增强 CT 的确诊;中医证型诊断标准参照《中医外科学·脱疽》^[6],经两位主任中医师辨证,符合血瘀证(营养障碍期)的临床表现。排除 2 周以内针对 ASO 接受过中西药物治疗者。ASO 患者入院后第 2 天空腹抽取静脉血 3 mL,于离心管中自凝后,4 °C、2 500 r/min 离心 15 min,取血清置无菌 EP 管中,56 °C 灭活 30 min, -20 °C 保存备用。

2.3 含药血清制备及分组 通过随机数字表法将大鼠随机分成 3 组:桃红四物汤低浓度、中浓度、高浓度组,每组 5 只。每日给予相应的中药加生理盐水稀释成 3 mL 灌胃,连续 7 日,参照既往实验方法^[7],于末次给药后 1 h,麻醉并通过下腔静脉采血,无菌分离出血清,56 °C 灭活 30 min,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,将每组大鼠的血清混合, -20 °C 保存备用。

2.4 内皮细胞培养系统给药方法 内皮细胞经胰酶消化后,用含 15% FBS 的 DMEM-high 培养液(含有 1 × 10⁵ U/L 青霉素、100 mg/L 链霉素)制成单细胞悬液,以浓度 1 × 10⁵ /mL 接种于 96 孔板中,进行分组干预,分为空白对照组、ASO 血瘀证血清组、桃红四物汤低、中、高浓度组,待内皮细胞贴壁后,各组分别加入 10% DMEM 培养液、10% ASO 血瘀证血清、10% ASO 血瘀证血清加桃红四物汤低、中、高浓度血清各 100 μL,每组 8 个复孔,4 周后用 PBS 封孔,继续培养 24 h。

2.5 内皮细胞增殖能力测定 终止培养后, PBS 洗去培养液,加入 MTT 溶液,每孔 20 μL,细胞培养箱内孵育 4 h,后弃孵育液加 DMSO 150 μL,10 min 振荡混匀,使结晶充分溶解,选用 490 nm 波长在酶标仪上测定吸光度值。

2.6 透射电镜检测 终止培养后, PBS 清洗 3 次,胰酶消化,再用 PBS 重悬细胞,1 000 r/min 离心 5 min,加入 2.5% 戊二醛固定,再经过漂洗,梯度脱水, Epon 812 浸透、包埋、聚合,超薄切片,醋酸铀、

柠檬酸铅染色,透射电镜下观察、摄片,检测内皮细胞超微结构。

2.7 钙离子浓度测定 终止培养后,将内皮细胞取出培养皿,移去原培养液,PBS 缓冲液洗 2 遍,加入 1 mL 染料液(10 μmol/LFluo-3/AM 和 0.1% Pluronic F-127),37 ℃,继续孵育 30 min 后取出,PBS 清洗 3 次后激光共聚焦扫描显微镜观察,Fluo-3/AM 激发波长为 488 nm。

2.8 细胞骨架鬼笔环肽染色 终止培养后,将内皮细胞取出培养皿,移去原培养液,PBS 缓冲液洗 3 遍,加入 1 mL 多聚甲醛固定 15 min,然后 PBS 洗 3 次,每次 3 min,加入 0.1% TritonX-100 1 mL 做破膜处理,用 PBS 再洗 3 次后加山羊血清封闭 20 min,然后再用 FITC-鬼笔环肽在室温避光条件下染色 20 min,加入 2 μL DEPI,在同样条件下继续染色 10 min,PBS 清洗 3 次后激光共聚焦扫描显微镜观察。

2.9 内皮细胞分泌功能测定 终止培养后,采用酶联免疫吸附(ELISA)双抗体夹心法对各组内皮细胞培养液上清中 ET、NO 和 TGF-β₁ 的含量进行检测,具体检测过程严格按照试剂盒中说明书步骤进行操作,于 540 nm 处检测各孔吸光度(OD)值,根据标准品浓度及相应 OD 值拟合标准曲线及方程,计算各检测孔中待测因子的浓度。

2.10 统计学方法 采用 SPSS 11.0 进行统计描述和分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组内皮细胞的增殖活性比较(表 1) 空白对照组内皮细胞具有良好的增殖活性,与 ASO 血瘀证血清共培养后,内皮细胞出现了明显的损伤,表现为细胞增殖活性明显下降。经用桃红四物汤血清共孵育后,内皮细胞的增殖活性明显提高,细胞的损伤状态有了明显的改善。

表 1 各组内皮细胞的增殖活性及钙离子浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	增殖活性 (OD 值)	钙离子浓度 (荧光强度)
空白对照	8	0.29 ± 0.04	60.80 ± 11.12
ASO 血瘀证血清	8	0.19 ± 0.08 *	128.99 ± 20.21 *
桃红四物汤低浓度	8	0.22 ± 0.04	125.59 ± 19.19
中浓度	8	0.25 ± 0.08 Δ	104.33 ± 21.25 Δ
高浓度	8	0.33 ± 0.09 ΔΔ	86.17 ± 18.62 ΔΔ

注:与空白对照组比较,* $P < 0.01$;与 ASO 血瘀证血清组比较,Δ $P < 0.05$,ΔΔ $P < 0.01$

2 各组内皮细胞超微结构比较(图 1) 空白对照

组内皮细胞核椭圆形,核仁核膜清楚,核内染色质分布均匀。胞质内可见核糖体、线粒体、粗面内质网、溶酶体、高尔基复合体及脂滴等细胞器。ASO 血瘀证血清组内皮细胞核形不规则,核膜部分模糊,核内异染色质凝聚,胞质有小面积的溶解,胞质内核糖体、粗面内质网、线粒体、高尔基复合体等细胞器明显减少。桃红四物汤含药血清干预后,内皮细胞的微观结构有了明显改善,内皮细胞核及核仁核膜逐渐清楚,胞质内核糖体、线粒体、粗面内质网及高尔基复合体等细胞器逐渐增多。

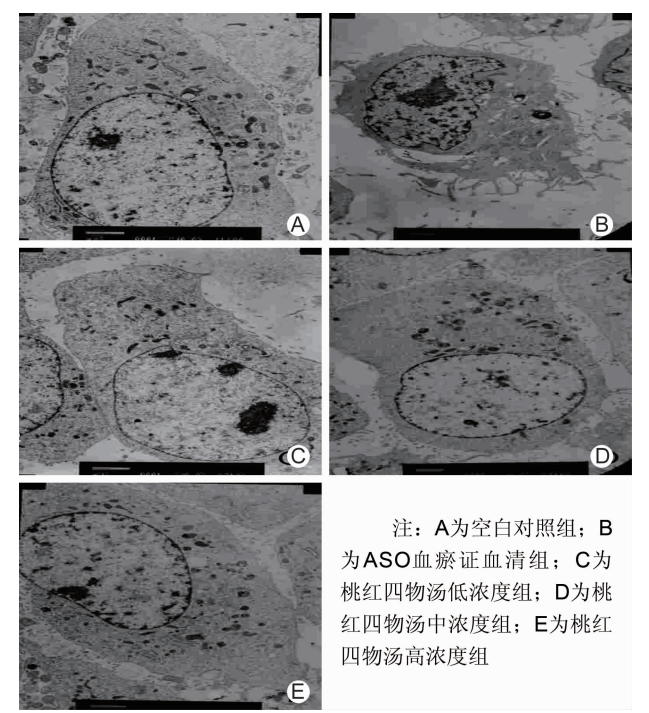


图 1 各组内皮细胞的超微结构 (透射电镜,×4 000)

3 各组内皮细胞的钙离子浓度测定比较(表 1,图 2) 空白对照组细胞内钙离子荧光强度正常,ASO 血清损伤后细胞内钙离子荧光强度明显增高,经用桃红四物汤血清共孵育后,细胞内钙离子荧光强度明显下降。

4 各组内皮细胞的细胞骨架鬼笔环肽染色结果(图 3) 空白对照组内皮细胞骨架呈丝网状排列清晰有序。ASO 血瘀证血清组细胞形态皱缩,细胞骨架排列紊乱且微丝明显减少或部分缺失。桃红四物汤含药血清干预后,细胞形态趋向规则,随含药血清浓度增高,细胞骨架呈现丝网状排列且清晰可见。

5 各组内皮细胞培养液中 ET-1、NO 及 TGF-β₁ 含量比较(表 2) ASO 血瘀证血清组 ET、NO 及 TGF-β₁ 含量明显升高($P < 0.05$),ET/NO 比例失衡。经用桃红四物汤血清共孵育后,内皮细胞的 ET、NO 及 TGF-β₁ 水平下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),ET/NO 比例趋于正常。

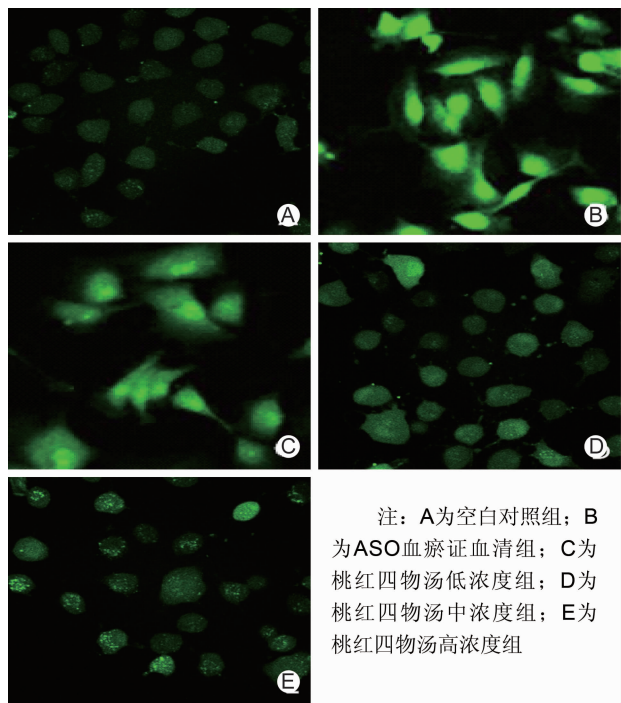


图2 各组内皮细胞的钙离子浓度测定图像
(激光共聚焦显微镜, ×400)

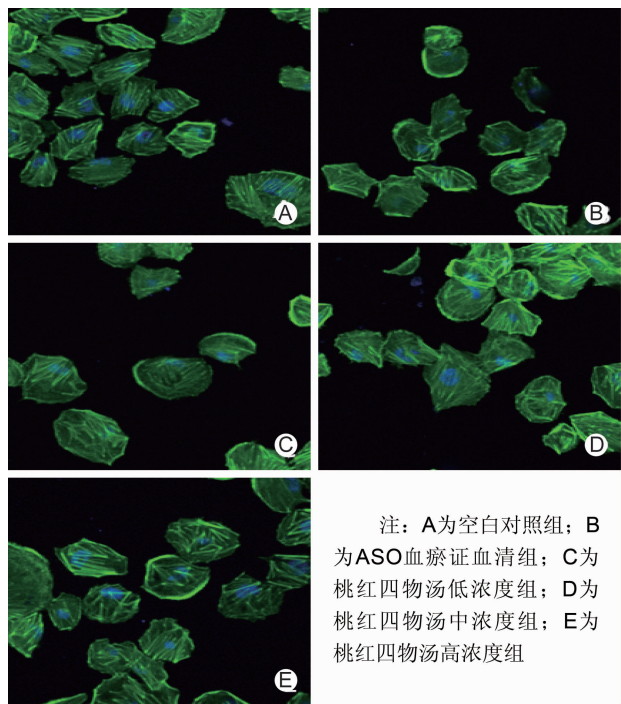


图3 各组内皮细胞的细胞骨架鬼笔环肽染色结果
(激光共聚焦显微镜, ×400),

讨 论

ASO 是动脉粥样硬化所致的慢性动脉闭塞性疾病,是全身动脉硬化性病变在下肢的重要表现,亦是周

表2 各组内皮细胞培养液中 ET、NO 及
TGF-β₁ 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ET-1 (ng/L)	NO (μmol/L)	TGF-β ₁ (ng/L)
空白对照	8	3.52 ± 0.52	90.80 ± 11.12	1.42 ± 0.25
ASO 血瘀证血清	8	9.12 ± 1.38 *	128.99 ± 20.21 *	3.10 ± 0.95 *
桃红四物汤低浓度	8	7.06 ± 1.64 [△]	125.59 ± 19.19	2.33 ± 0.52 [△]
中浓度	8	5.94 ± 1.28 ^{△△}	124.33 ± 21.25	1.95 ± 0.45 ^{△△}
高浓度	8	5.23 ± 0.58 ^{△△}	116.17 ± 18.62 ^{△△}	1.87 ± 0.29 ^{△△}

注:与空白对照组比较,**P* < 0.01;与 ASO 血瘀证血清组比较,
[△]*P* < 0.05, ^{△△}*P* < 0.01

围动脉疾病的重要组成部分。ASO 属于中医学“脱疽”的范畴,在不同阶段虽可分为寒湿证(局部缺血期)、血瘀证(营养障碍期)、热毒证(坏疽期)等中医证型,但血瘀一直是该病重要的病理过程,气血凝滞、经脉阻塞为该病的主要病机^[6],临床上往往舍证从病,以大剂量活血化瘀甚则破血逐瘀药物贯穿治疗的始终,希望借以建立侧支循环,改善肢体血运。本研究建立 ASO 血瘀证血清内皮细胞损伤模型,观察内皮细胞损伤和分泌功能的失调及活血化瘀经典方桃红四物汤的调节作用,为 ASO 病证结合细胞模型的深入研究提供实验依据。

本研究发现,与 ASO 血瘀证血清共培养后,内皮细胞出现了明显的损伤,表现为细胞增殖活性明显下降;鬼笔环肽染色显示细胞形态皱缩,细胞骨架排列紊乱且微丝明显减少或部分缺失;透射电镜检测显示 ASO 血清组内皮细胞超微结构发生了明显异常变化,且细胞质有小面积的溶解;ASO 血清损伤后细胞内钙离子荧光强度明显增高,细胞内钙离子浓度的突然增高是细胞损伤的重要因素^[8],与细胞形态、细胞骨架的损伤密切相关。经用桃红四物汤血清共孵育后,内皮细胞的损伤状态有了明显的改善,表现为细胞的增殖活性明显提高;细胞形态趋向规则,细胞骨架呈现丝网状排列且清晰可见;内皮细胞的微观结构渐趋正常;细胞内钙离子荧光强度明显下降,随着药物浓度的增高,这些作用均有所增强,提示了桃红四物汤能够抑制钙离子内流,减轻内皮细胞的损伤。

与 ASO 血瘀证血清共培养后,内皮细胞的分泌功能亦发生了明显的改变,透射电镜检测显示,ASO 血清组内皮细胞中具有蛋白质合成、加工、转运功能的核糖体、粗面内质网、线粒体、高尔基复合体等细胞器明显减少。ELISA 检测显示内皮细胞分泌的 ET、NO 和 TGF-β₁ 均发生了明显的改变。ET-1 是由血管内皮细胞分泌的一种强有力的收缩肽,具有强烈的缩血管和促细胞增殖作用^[9,10],是目前所知作用最强和作

用时间最持久的缩血管物质。NO 亦由血管内皮细胞分泌,在生理浓度下能舒张血管,并能抑制血管平滑肌细胞的增殖及迁移^[11,12]。生理状态下,ET-1 与 NO 处于动态平衡之中,维持着血管舒缩功能的正常,两者的平衡失调是引发动脉粥样硬化及各种血管并发症的始动因素之一。TGF- β_1 是具有多重生物学活性的细胞因子,诱导内皮细胞表达黏附分子,促进血管新生,刺激细胞外基质产生,与动脉粥样硬化发生密切相关^[13,14]。本研究发现,ASO 血瘀证血清组 ET 及 TGF- β_1 含量明显升高,ET/NO 比例失衡。经用桃红四物汤血清共孵育后,内皮细胞的各种细胞器数量增多,TGF- β_1 水平下降,ET/NO 比例趋于正常,提示了桃红四物汤能够改善血管内皮细胞的分泌功能,抑制动脉粥样硬化及其血管并发症的进程。

桃红四物汤方以四物汤(芍药、熟地黄、川芎、当归)为基础,加桃仁、红花而成,主要功效为养血活血。本方以桃仁、红花为主活血化瘀;以熟地补血滋阴、当归活血补血,芍药和营养血;川芎行气活血,“气行则血行”,以增化瘀之效。诸药同用共奏调畅气血之功。现代药理学研究表明,桃仁中含有乙酸乙酯等,有显著的抗血栓作用^[15]。红花的主要有效成分为查耳酮类化合物红花黄色素(safior yellow, SY),有抑制血小板聚集及抗氧化等作用。当归、川芎中含有的蒿本内酯具有缓解血管平滑肌痉挛与抗血小板聚集的作用。芍药的主要成分芍药苷具有抑制血小板及红细胞聚集的作用。另外,桃红四物汤药味中多含有黄酮类化合物,具有降血糖、降血脂、降血压等作用^[16]。

综上所述,血管内皮细胞的损伤和分泌功能失调是血瘀证 ASO 发病的重要病理过程,桃红四物汤对此具有明显的改善作用,这可能是活血化瘀中药能够用于治疗动脉粥样硬化及其血管并发症的重要机制之一。

参 考 文 献

- [1] Idei N, Nishioka K, Soga J, et al. Vascular function and circulating progenitor cells in thromboangiitis obliterans (Buerger's disease) and atherosclerosis obliterans [J]. Hypertension, 2011, 57(1): 70-78.
- [2] 王远航,李微.活血化瘀中药在动脉粥样硬化形成中对血管内皮细胞功能的影响[J].中国中医急症,2009,18(3): 431-432.

- [3] 盛松,徐凤芹.活血化瘀中药抗动脉粥样硬化的作用机制研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2013,11(5): 591-592.
- [4] 陈奇,中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:1103-1105.
- [5] 吴在德,吴肇汉.外科学[M].第7版.北京:人民卫生出版社,2008:603-605.
- [6] 李曰庆.中医外科学[M].第9版.北京:中国中医药出版社,2012:314-318.
- [7] 李大勇,陈文娜,谷峰,等.疏肝活血方含药血清对大鼠骨髓源性内皮祖细胞血管新生相关基因表达的影响[J].中国现代中药,2012,12(3): 30-33.
- [8] 杨孝芳,王超,易受乡,等.电针内关对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞内钙离子浓度的调节[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(34): 6759-6761.
- [9] Raina A, Horn ET, Benza RL. The pathophysiology of endothelin in complications after solid organ transplantation: a potential novel therapeutic role for endothelin receptor antagonists [J]. Transplantation, 2012, 94(9): 885-893.
- [10] Chang CZ, Wu SC, Kwan AL, et al. 6-mercaptopurine reverses experimental vasospasm and alleviates the production of endothelins in NO-independent mechanism—a laboratory study [J]. Acta Neurochir (Wien), 2011, 153(4): 939-949.
- [11] Madden JA. Role of the vascular endothelium and plaque in acute ischemic stroke [J]. Neurology, 2012, 79(13 Suppl 1): S58-S62.
- [12] Sun L, Zhao R, Zhang L, et al. Salvianolic acid A inhibits PDGF-BB induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation while does not constrain endothelial cell proliferation and nitric oxide biosynthesis [J]. Molecules, 2012, 17(3): 3333-3347.
- [13] Sternberg Z, Ghanim H, Gillotti KM, et al. Flow cytometry and gene expression profiling of immune cells of the carotid plaque and peripheral blood [J]. Atherosclerosis, 2013, 229(2): 338-347.
- [14] Wang X, Abraham S, McKenzie JA, et al. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signaling [J]. Nature, 2013, 499(7458): 306-311.
- [15] 汪宁,刘青云,彭代银.桃仁不同提取物抗血栓作用的实验研究[J].中药材,2002,25(6): 414-415.
- [16] 居一春,李祥.桃红四物汤化学成分研究进展[J].医药导报,2008,27(5): 575-577.

(收稿:2013-11-28 修回:2015-08-05)