

通心络超微粉对“络气虚滞”大鼠血管氧化损伤的保护作用

袁凌燕^{1,2} 张红旗³ 徐丹令¹ 王克强¹ 邹云增¹ 贾剑国¹ 李冰玉¹ 孙爱军¹ 郝颖¹ 葛均波¹

(1. 复旦大学附属中山医院心血管病研究所, 上海市枫林路 180 号, 200032;

2. 上海师范大学体育学院; 3. 复旦大学上海医学院)

[摘要] **目的** 从烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化损伤途径,探讨通心络超微粉保护络脉“络气虚滞”大鼠血管内皮的作用机制。**方法** 选用8周龄SD大鼠,采用力竭性跑台运动,并结合基础饮食建立气虚证候模型,同时采用 $200\text{ng} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ 血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)建立大鼠络脉“络气虚滞”的病理证候复合模型,随机分成正常组、模型组和通心络组,每组10只。14天后测定血内皮素(ET)、一氧化氮(NO)、AngⅡ、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、主动脉内皮形态结构及主动脉内皮核转录因子 κ B(NF- κ B)、血管细胞黏附分子1(VCAM-1)、内皮一氧化氮合酶(eNOS)的表达。**结果** 模型组大鼠内皮见内皮细胞成片脱落,通心络组血管内皮仅有轻微的损伤;模型组血ET、IL-6、TNF- α 增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),NO降低($P < 0.05$),通心络可以增加血清NO含量,降低血ET、IL-6、TNF- α ($P < 0.05$);模型组p22^{phox} mRNA($P < 0.01$)、NF- κ B、VCAM-1表达增加,eNOS表达降低,通心络可不同程度地逆转上述变化。**结论** 通心络通过减少血管NADPH-氧化-炎症损伤途径,减轻血管内皮损伤。

[关键词] 通心络超微粉;血管紧张素Ⅱ;内皮损伤;氧化应激;络气虚滞

Protective Effect of Tongxinluo Superfine Powder on Oxidative Injury in Rats with Qi Deficiency and Blood-Stasis Blocking Collaterals

YUAN Lingyan^{1,2}, ZHANG Hongqi³, XU Danling¹, et al.

(1. Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032; 2. Institute of Physical Education of Shanghai Normal University;

3. Shanghai Medical College, Fudan University)

ABSTRACT **Objective** To investigate the mechanism of Tongxinluo Superfine Powder (Powder for removing obstruction of collaterals) in protecting the endothelium by observing the endothelium oxidative injury caused by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) in rats with qi deficiency and blood-stasis blocking collaterals. **Methods** The animal model of “qi deficiency and blood-stasis blocking collaterals” was induced by starvation and exhaustion exercise in 8-week-old SD rats and endothelium injury was established by angiotensin Ⅱ infusion at a rate of 200ng/kg per min. The SD rats were randomly divided into 3 groups: control group, model group and Tongxinluo group with 10 in each. After treatment of 14 days, the content of endothelin (ET), nitric oxide (NO), angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), morphology of endothelial cells in the thoracic aorta, and the nuclear κ B (NF- κ B), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in aorta were observed. **Results** In the model group, there existed the massive cell detachments in vascular endothelium, while in Tongxinluo group, only a mild injury was observed. The blood ET, IL-6 and TNF- α increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), NO decreased ($P < 0.05$) in the model group, while in Tongxinluo group, the result was opposite. The p22^{phox} mRNA ($P < 0.01$), NF- κ B, and VCAM-1 expression increased significantly in the model group, moreover, eNOS expression decreased. These changes in Tongxinluo group were reversed to different degrees. **Conclusion** Tongxinluo protects endothelium by inhibiting NADPH-oxidation-inflammatory injury of vessels in rats with qi deficiency and blood-stasis blocking collaterals.

Key Words Tongxinluo Superfine Powder (Powder for removing obstruction of collaterals); Angiotensin Ⅱ; Endothelium injury; Oxidative stress; Qi-deficiency and blood stasis blocking collaterals

血管内皮功能障碍是血管性疾病的始动因素和关键环节,氧化应激是损伤血管内皮的重要因素。血管内皮细胞和平滑肌细胞的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate,

NADPH)氧化酶是血管局部活性氧合成的主要酶系,其中p22^{phox}蛋白作为在维持酶的活性和产生活性氧的过程中起关键作用^[1]。根据络脉“络气虚滞”理论,“络气虚滞”引起的络脉自稳状态功能异常与血管内皮功能障碍具有内在一致性^[2]。在前期研究的基础上^[3],本研究从NADPH-氧化-炎症损伤通路入手,检测内皮形态、血管活性物质、炎症因子等表达,探讨络脉“络气虚滞”与内皮功能障碍的相关性。并基于“络以通为

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)资助项目

(2005CB523302, 2004CB02F000803)

通讯作者:王克强, wkg-2000@yahoo.com.cn, (021) 64041990 转

630660

China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用"的指导思想,进一步观察具有益气活血、搜风通络作用的中药复方制剂通心络胶囊的作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组与给药

采用 8 周龄雄性 SD 大鼠[中国科学院上海实验动物中心购买,动物合格证号:SCXK(沪) 2007-0005], 体重 180~200g,剔除不适合运动和运动能力很强的大鼠,淘汰率为 30%。按体重标号,按随机数字表法分为正常组、模型组、通心络组,每组 10 只。大鼠均单笼饲养,实验全过程连续按基础进食量(即成龄大鼠静息状态下日采食量)进食,每只大鼠每日喂饲料 5g/100g,自由饮水。通心络组在造模后即给予每千克体重 0.8g 通心络超微粉灌胃(临用时以 0.5%羧甲基纤维素钠混悬)。

1.2 动物模型制备

参考以岭研究院用同型半胱氨酸结合游泳制作气虚模型的方法^[4],本研究采用力竭运动加基础饮食(气虚证候因素)结合血管紧张素 II(Ang II)制作脉络"络气虚滞"动物模型。根据预实验达到气虚状态的时间和前期内皮损伤结果,实验时间为 14 天。

1.2.1 内皮损伤病理模型制备 采用背部埋埋 Ang II 的药物缓释泵,在不升高血压的情况下,损伤内皮,模型稳定^[3]。Ang II 溶液的配制:按照 200ng·min⁻¹·kg⁻¹ Ang II 的致内皮损伤剂量和缓释泵的释放速度,计算出 14 天所需 Ang II 量,加 0.01mol 醋酸生理盐水至 2ml。术后肌肉注射青霉素 3 天预防感染。

1.2.2 气虚证候模型制备 手术后 3 天始施加基础饮食和运动因素,每天根据动物状态,采用跑台运动(20~30m/min,坡度 10°)至力竭。力竭标准为大鼠跟不上跑台速度,持续落后电极 30s,跑步姿势改变,驱赶无效,跑后体征表现为呼吸急促,神情倦怠,俯卧位,对刺激反应迟钝^[5]。气虚证候的判定参考全国中西医结合虚证与老年病会议制定的虚证辨证标准^[6]。

1.3 试剂、药品及主要仪器

通心络超微粉[河北以岭医药研究院,国药准字(1998)Z-217 号];Ang II(Sigma, A 9525-50mg,批号 37K5102);内皮素(ET)、Ang II 试剂盒(北京北方生物技术研究所,批号 20070624,20070318);一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20070312);白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 αTNF-α ELISA(美国 RD 公司,批号分别为 07082101,07100702);一氧化氮合酶(eNOS,兔抗大鼠),核转录因子 kappa B(NF-κB(p65),小鼠抗大鼠),血管细胞黏附分子 1(VCAM-1,兔抗大鼠)多克隆抗体为美国 san-

ta cruze 公司产品,批号分别为 sc-654, sc-109, sc-8304。EnVision 试剂(HRP)即用型(丹麦 DAKO 公司);TUNEL(KGA-703)。Trizol(Invitrogen,批号 1373341),RT 试剂盒(TOYOBO,批号 71750C2)。扫描电镜(Philips XL30ESEM),图像分析系统(Leica 公司)。药物缓释泵(Osmotic Pump,Model 2ml)由日本 Alzet 公司生产(美国健康医疗国际公司购买,批号 10129-05)。

1.4 样品采集

样品采集前 12h 禁食禁水,氯胺酮麻醉后,经心脏取血,按常规抗凝离心。开胸,快速分离并取下主动脉弓、胸主动脉同一部位分别用作电镜、石蜡切片,肾脏-70℃冻存备用。

1.5 生化指标测定

采用放射免疫法测定 ET、Ang II;采用硝酸还原酶法测定 NO;ELISA 法测定 IL-6 和 TNF-α 含量。均严格按照试剂盒说明书操作。

1.6 主动脉形态的观察

10%中性甲醛灌注固定后,取胸主动脉同一部位,并固定于 2.5%戊二醛内备用,扫描电镜观察内皮形态。胸主动脉石蜡切片,进行细胞凋亡检测,采用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 末端缺口标记法(Tunel 法)原位检测血管壁细胞凋亡。

1.7 免疫组织化学检测主动脉 eNOS、ICAM-1、NF-κB 的表达

主动脉石蜡切片常规处理后,采用 Envision 法。其中一抗 eNOS(1:100),NF-κB(1:80),VCAM-1(1:200) 37℃,孵育 2h;EnVision 试剂(HRP-M/R) 37℃ 30min;DAB 显色 8~12min;苏木素衬染,镜下观察,NF-κB(p65)以内皮细胞核黄染为阳性细胞,eNOS 和 VCAM-1 以细胞膜和细胞浆黄染为阳性。

1.8 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

取 50mg 肾脏用 Trizol 试剂提取总 RNA,计测 A 260 和 A 280 值,以检测纯度并定量。逆转录-聚合酶链反应:①逆转录的合成反应:按说明书操作。②引物合成:上海生工合成 P22 引物。上游引物:5'-CGGGCT-GTCCTCCACTTACTGC-3',P22 下游引物:5'-TGATGGTGCCTCCAACCTGCG-3',扩增长度 178bp;GAPDH 上游引物:5'-ACCACAGTCCAT-GCCATCAC-3',下游引物:5'-TCCACCACCCT-GTTGCTGTA-3',扩增长度 452bp。③PCR 反应体系(25 μl):cDNA 1 μl,上、下游引物各 0.5 μl,2×PCR-mix 12.5 μl,ddH₂O 10.5 μl。④反应条件:94℃×3min,95℃×30s,52℃×30s,72℃×30s,34 个循环,最后

附表 各组大鼠血管活性物质、炎症因子测定结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ET (pg/ml)	Ang II (pg/ml)	NO (μmol/L)	IL-6 (pg/ml)	TNF-α (pg/ml)
正常组	10	78.1 ± 11.3	210.4 ± 54	124.4 ± 47.3	35.13 ± 5.3	36.7 ± 7.8
模型组	10	123.8 ± 15.9**	383.0 ± 48**	73.6 ± 12.8*	47.1 ± 5.8**	44.7 ± 1.9*
通心络组	10	116.2 ± 20.5	330.7 ± 53▲	90.6 ± 20.3	39.5 ± 7.5	38.0 ± 6.8▲

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,▲ $P < 0.05$

72℃延伸 5min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳鉴定,凝胶成像系统进行分析,以p22phox 吸光度值与GAPDH 吸光度值的比作为p22phox mRNA 表达半定量值。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 11.0 统计分析软件处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠行为学比较

正常组大鼠体重稳步上升,至实验结束体重达(258.6 ± 14.5)g。模型组体重下降明显为(156.4 ± 5.7)g。正常组小鼠活动如常,毛色光泽。模型组出现明显的倦怠乏力,反应不灵敏。全身毛发枯槁、竖立、色枯,皮毛松弛,背部毛发少光泽;缩肩拱背,精神萎靡,眼睑下垂,反应明显迟钝。

2.2 各组大鼠血管活性物质、炎症因子变化比较

附表示,模型组血管活性物质ET、Ang II 及炎症因子IL-6、TNF-α升高,NO 降低,通心络可降低ET、Ang II、IL-6、TNF-α升高 NO 水平,其中 Ang II、TNF-α的改变有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠主动脉内皮形态及凋亡变化比较

正常组细胞形态呈梭形或不规则形结构,细胞结构轮廓较清晰,中央部隐约可见隆起的细胞核。内皮细胞的长轴与血流的方向一致。模型组内皮细胞成片脱落,皮下组织和内弹力板裸露,表面粗糙不平,有时见血小板和白细胞黏附。通心络组内皮仅有轻微的损伤,内皮大部分已经修复。正常组未见TUNEL 着染,模型组细胞核TUNEL 标记着染呈棕黄色,通心络组凋亡现象不明显,局部可见少数细胞TUNEL 标记着染呈棕黄色。TUNEL 棕黄色阳性信号位于胞核。

2.4 各组大鼠主动脉NF-κB、VCAM-1、eNOS 及肾脏p22phox mRNA 的表达

正常组主动脉NF-κB 胞浆中有少量表达,核内无表达,模型组平滑肌细胞核见NF-κB(p65)阳性表达,通心络组相对模型组表达有所减少。正常组主动脉VCAM-1 无表达,模型组、通心络组内皮层见阳性表达物质,通心络组相对模型组表达明显减少。而正常组

内皮层可见明显的eNOS 表达,模型组表达明显减弱,通心络组表达相对模型组有所增强。和正常组比较,模型组肾脏p22phox mRNA 表达增加($P < 0.01$),通心络可下调p22phox mRNA 表达($P < 0.01$)。

3 讨论

依据络病理论研制成的通心络胶囊应用于血管病变的治疗,开辟了运用通络方药防治血管病变的有效途径^[2]。本研究根据“脉络—血管系统病”理论,选择“脉络—血管系统病”的始动因素——“络气虚滞”,作为运用络病理论研究血管病变的切入点。本研究发现,脉络“络气虚滞”大鼠主动脉出现内皮损伤和凋亡,同时证实通心络超微粉对血管内皮具有保护作用。“大凡络虚,通补最益”,因此“络虚通补”的治法也适用于“络气虚滞”的治疗,体现了应用络病理论指导血管病变的科学价值。

血管内皮为全身最大的内分泌器官,通过合成和释放一系列血管活性物质进入血液,影响血液的运行和血管的舒缩。内皮细胞通过产生血管活性物质如NO、Ang II 等调节血管张力及结构。本研究中模型组大鼠血ET、Ang II 升高,NO 降低,炎症因子IL-6、TNF-α升高,eNOS、VCAM-1 表达上调,表明“络气虚滞”大鼠血管内皮出现分泌失衡。本研究还观察到,模型组内皮细胞成片脱落,皮下组织和内弹力板裸露,表面粗糙不平,有时见血小板和白细胞黏附,血管细胞凋亡明显。血管内皮损伤后,ET、NO 分泌失常,进一步使血管受损。通心络使内皮损伤减轻,凋亡减少,说明通心络对“络气虚滞”大鼠内皮具有保护作用,通心络可调整失衡的内皮内分泌功能,降低ET、Ang II、IL-6、TNF-α升高NO 水平。

Ang II 处于肾素血管紧张素醛固酮系统的核心地位,循环及局部的Ang II 作为血管活性肽,介导内皮细胞损伤,诱导内皮细胞凋亡,使内皮功能紊乱,加速动脉粥样硬化和高血压的进展。前期研究证实,Ang II 可导致内皮损伤^[3]。本实验采用的Ang II 结合力竭运动病证复合模型,发现此复合模型内皮损伤加重。

研究证实,Ang II 是NADPH 氧化酶重要的刺激因子^[7],Ang II 通过受体AT1 上调NADPH 氧化酶,使

氧化应激升高,上调激活NF- κ B,诱导靶黏附分子的合成^[8]。因此,本研究从NADPH 氧化途径,进一步对Ang II 活性氧通路与血管内皮功能障碍的相关性进行研究。结果显示,与正常组比较,模型组肾脏p22phox mRNA 表达增加,伴有模型组主动脉平滑肌细胞核见NF- κ B(p65) 阳性表达。本研究虽未直接检测ROS 水平,但从NADPH 氧化酶亚成分p22phox 水平和NF- κ B 的,可知“络气虚滞”大鼠体内NADPH 氧化途径被激活,存在氧化应激升高。

NF- κ B 是最早被发现的氧化应激敏感的转录因子之一,NF- κ B 的激活被认为是血管内皮细胞受损的始动机制之一。其借助p65 作用于靶基因如ICAM-1、VCAM-1 等黏附分子和细胞因子,使表达增加^[9]。本研究检测到模型组胞核内出现p65,说明模型组NF- κ B 被激活并向核内转移。

VCAM-1 是重要的黏附分子,在动脉粥样硬化的发生发展过程中发挥重要作用^[11]。本实验免疫组化结果显示,模型组主动脉VCAM-1 和NF- κ B 表达增加,这与文献报道一致。与模型组比较,通心络组NF- κ B 表达明显减少,VCAM-1 表达亦明显降低,提示通心络超微粉至少部分通过抑制NF- κ B 通路来降低黏附分子的表达,结合通心络降低p22phox 表达的结果,考虑通心络超微粉抑制NF- κ B 核转位进而降低黏附分子表达的作用与其抗氧化作用密切相关,提示抑制NF- κ B 核转位通路是通心络超微粉抗氧化保护血管内皮的可能作用机制之一。

通心络由人参、全蝎、蜈蚣、蝉蜕、水蛭、土鳖虫、赤芍、酸枣仁、降香、冰片等药物组成。全方以络虚通补药为主,辅以虫类化瘀通络药、虫类搜风通络药和辛味通络药组方,具有益气活血,搜风通络作用。“大凡络虚,通补最益”,因此“络虚通补”的治法也适用于“络气虚滞”的治疗。本研究发现,脉络“络气虚滞”大鼠主动脉出现内皮损伤和凋亡,证实了通心络超微粉对血管内皮具有保护作用,其作用途径可能通过抑制“络气虚

滞”的氧化应激,减少NF- κ B 向核内移位,从而减少VCAM-1 的表达,上调减少eNOS 的表达。其抗氧化、抗炎症、抗凋亡的多个环节之间的联系尚有待进一步研究。

参考文献

[1]Berry C, Humilton CA, Brosnan MJ, et al. Investigation into the sources of superoxide production in human internal mammary arteries[J]. Circulation, 2000, 101(18) : 2206—2212.

[2]吴以岭.“脉络—血管系统病”新概念及其治疗探讨[J]. 疑难病杂志, 2005, 4(5) : 285—287.

[3]张红旗, 徐丹令, 郝颖, 等. 用血管紧张素 II 缓释泵制作大鼠血管内皮损伤模型探讨一种大鼠内皮损伤模型的新方法[J]. 中国临床医学, 2007, 14(4) : 451—454.

[4]梁俊清, 吴以岭, 贾振华, 等. 络气虚滞大鼠动脉组织血红素加氧酶/一氧化碳系统的变化及人参、双参、通心络的干预[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(7) : 782—785.

[5]肖明珠. 动物运动性疲劳方法学研究之一[J]. 中国运动医学杂志, 1998, 17(4) : 334—338.

[6]柯雪帆主编. 中医辨证学[M]. 上海: 上海中医学院出版社, 1987: 122.

[7]Shringarpure R, Davies KJ. Protein turnover by the proteasome in aging and disease[J]. Free Radic Biol Med, 2002, 32(11) : 1084—1089.

[8]Granger DN, Vowinkel T, Petnehazy T. Modulation of the inflammatory response in cardiovascular disease[J]. Hypertension, 2004, 43(5) : 924—931.

[9]Pueyo ME, Gonzalez W, Nicoletti A, et al. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor-kappa B activation induced by intracellular oxidative stress[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000, 20(3) : 645—651.

[10]Chen YH, Lin SJ, Ku HH, et al. Salvianolic acid B attenuates VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF-alpha treated human aortic endothelial cells[J]. J Cell Biochem, 2001, 82(3) : 512—521.

(收稿日期: 2008—05—27; 修回日期: 2009—01—12)

[编辑: 行 之]

(上接第 634 页)

证候诊断标准进行了有益探索,初步阐释了艾滋病证候的诊断规律,为艾滋病临床辨证论治提供了客观依据。

参考文献

[1]国家技术监督局. 中华人民共和国国家标准: HIV/AIDS 诊断标准及处理原则[EB/OL]. (2003—07—01) [2008—09—05]. <http://www.chain.net.cn/wzhg/7948.htm>

[2]国家技术监督局. 中医临床诊疗术语[M]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 30—34.

[3]丛华, 张启明. 肺病辨证用药的 Logistic 回归分析[J]. 山东中医药大学学报, 2002, 26(5) : 322—326.

[4]余学庆, 李建生, 庆慧. 中风病证候影响因素的研究[J]. 新中医, 2003, 35(11) : 20—22.

(收稿日期: 2008—09—09; 修回日期: 2008—12—23)

[编辑: 行 之]