

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.19.019

益气凉血生肌方对血管内皮细胞损伤后细胞形态学的影响

苏菲¹, 孙娅楠², 崔晓云³, 林谦^{3*}

(1. 北京中医药大学, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029; 2. 中国中医科学院医学实验中心; 3. 北京中医药大学东方医院)

摘要 目的 从血管内皮细胞形态学方面探讨益气凉血生肌方降低冠心病介入术后远期心血管事件的作用机制。方法 20 只大白兔随机分为正常组、生理盐水组、中药组、西药组和中西医结合组, 每组 4 只。中药组灌胃益气凉血生肌方 2.3 g/(kg·d), 西药组灌胃氯沙坦钾片 0.115 g/(kg·d), 中西医结合组间隔 30 min 分别灌胃等剂量的益气凉血生肌方和氯沙坦钾片, 生理盐水组灌胃等量 0.9% NaCl 溶液, 正常组不做任何处理。连续灌胃 5 天后耳缘静脉采血, 无菌分离血清。采用体外实验的方法, 对人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 采用血管紧张素 II (Ang II) 建立细胞损伤模型, 分为对照组、模型组、中药组、西药组、中西医结合组, 依次加入相应的 0.15 ml 15% 药物血清。培养箱培养 4~6 h 后采用倒置显微镜观察细胞整体形态变化、透射电镜观察细胞超微结构变化。结果 光镜下模型组细胞较对照组形态紊乱、生长缓慢, 进行药物干预后, 细胞生长加快, 形态恢复, 中西医结合组更明显。透射电镜下与模型组比较, 中药组、西药组和中西医结合组损伤内皮细胞的细胞核边界清楚、内质网增多增密、线粒体数目增加, 中药组和中西医结合组的内质网折叠更明显, 线粒体饱满、数目较西药组增多。结论 益气凉血生肌方在形态学上对损伤性血管内皮细胞有促进修复的作用, 能保护血管内皮的完整性, 从而减轻冠状动脉介入治疗对内皮细胞的损伤。

关键词 益气凉血生肌方; 血管内皮细胞; 冠脉动脉介入术; 细胞形态学

冠心病对健康的影响不容忽视, 冠状动脉介入性治疗的发展在很大程度上降低了急性冠脉综合征等不良事件的死亡率, 缓解了心肌缺血缺氧的应激状态。与此同时, 支架植入的过程中直接或间接地损伤了冠状动脉血管内皮细胞。这一环节是一系列心血管不良事件的始动因素^[1]。我们在临床应用益气凉血生肌方治疗冠心病已十余年, 可以降低介入后心血管事件的发生、改善患者的生存质量^[2]。本研究观察益气凉血生肌方对血管内皮细胞完整性的保护作用或者损伤修复作用, 进一步阐明其作用机制, 为临床应用提供科学、客观的证据支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物与细胞

20 只健康日本大白兔 (三级), 体重 (2.0 ± 0.23) kg, 雄性, 购自北京昌扬西山养殖场, 实验

动物许可证号: SYXK (京) 2010-0032。人脐静脉内皮细胞株 (HUVECs), 由中国中医科学院医学实验中心形态学实验室赠送。

1.2 实验设备与试剂

高压蒸汽灭菌锅 (日本三洋公司, 型号 MLS3750), 恒温恒压细胞培养箱 (Thermo 公司, 型号 309878-2767), 电加热恒温水浴箱 (上海威信公司, 型号 DK-8D), 透射电镜 (日立公司, 型号 H7650), 双人单面超净工作台 (Bio-Rad 公司, 型号 SW-CJ-2FD)。

血管紧张素 II (Ang II, Sigma 公司, 批号 A9525); 氯沙坦钾片 (50 mg/片, 美国默沙东公司, 批号 K008890); 益气凉血生肌方, 组成: 牡丹皮 10 g、丹参 15 g、黄芪 30 g、金银花 10 g, 由北京中医药大学东方医院中药房制药室制备成生药浓度为 2.6 g/ml; 0.9% NaCl 溶液 (石家庄四药股份有限公司, 批号 1504133603); 胎牛血清 (批号 NXE0628)、RPM1640 培养基 (批号 NZC1108)、

基金项目: 北京中医药大学薪火传承研究项目 (教-01101)

* 通讯作者: linqian62@126.com

Trypsin 胰酶 (批号 NXZ0809) 由赛默飞世尔科技有限公司生产, PBS 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2 ~ 7.4, Sunbio 公司, 批号 P7650)。

1.3 药物血清的制备

20 只日本大白兔采用 SPSS 17.0 软件生成随机数字表分为正常组、生理盐水组、中药组、西药组和中西医结合组, 每组 4 只。中药组灌胃益气凉血生肌方 2.3 g/ (kg · d), 西药组灌胃氯沙坦钾片 0.115 g/ (kg · d), 中西医结合组间隔 30 min 分别灌胃等剂量的益气凉血生肌方和氯沙坦钾片, 生理盐水组灌胃等剂量 0.9% NaCl 溶液, 正常组不做任何处理。各组均连续灌胃 5 天, 于最后 1 次灌药后 1 h (灌药前禁食但不禁水 12 h) 行耳缘静脉采血, 无菌分离血清并标号, 经 56℃、30 min 灭活处理后, -20℃ 冰箱保存备用。

1.4 造模方法与细胞分组

用 Ang II 作为细胞损伤模型建立的造模药物^[9]。分为对照组: 细胞培养液中不给任何药物; 模型组: 细胞培养液 + 生理盐水组血清 + Ang II; 中药组: 细胞培养液 + 中药组药物血清 + Ang II; 西药组: 细胞培养液 + 西药组药物血清 + Ang II; 中西医结合组: 细胞培养液 + 中西医结合组药物血清 + Ang II。

1.5 倒置显微镜观察各组细胞形态

取 0.5 ml 生长稳定、浓度为 1×10^6 个/ml 的 HUVECs, 于超净工作台内用 PBS 轻轻漂洗两遍,

加入 1 ~ 1.5 ml 的消化液进行消化、离心后接种到四分格培养皿中, 分为对照组、模型组、中药组、西药组、中西医结合组, 每组为一分格, 于 37℃、5% 的 CO₂、饱和湿度培养箱中培养并同化后, 依次加入相应的 15% 0.15 ml 药物血清和 1×10^{-6} mol/L 的 Ang II, 继续入细胞培养箱培养 4 ~ 6 h 后于倒置显微镜下观察并比较。

1.6 透射电镜观察各组细胞内超微结构

取生长稳定的 HUVECs, 如上法进行细胞的接种、同化、造模和药物干预后继续培养, 至细胞生长到铺满皿底时, 加入 0.25% 胰蛋白酶和 0.02% 乙二醇四乙酸进行消化, 15 ml 离心管离心, 1.5 ml 的 EP 管进行再次离心, 弃掉上清, 加入 2% 的戊二醛充分固定; 制定超薄切片厚度平均小于 100 nm。制作标本前样品充分漂洗 3 次, 通过再固定、漂洗、60 min 以上脱水、充分渗透、树脂包埋, 进行相应超薄切片及均匀染色后, 捞到铜丝网上面, 于透射电镜下观察 HUVECs 细胞的线粒体、细胞质、细胞核、内质网等超微结构。

2 结果

2.1 各组细胞整体形态比较

图 1 示, 对照组 HUVECs 细胞为贴壁样生长细胞, 细胞平铺于培养皿底部, 呈多角形、梭形或不规则形, 胞质均匀、大小均等; 模型组细胞损伤后形态紊乱、生长缓慢; 不同的药物干预后, 中药组

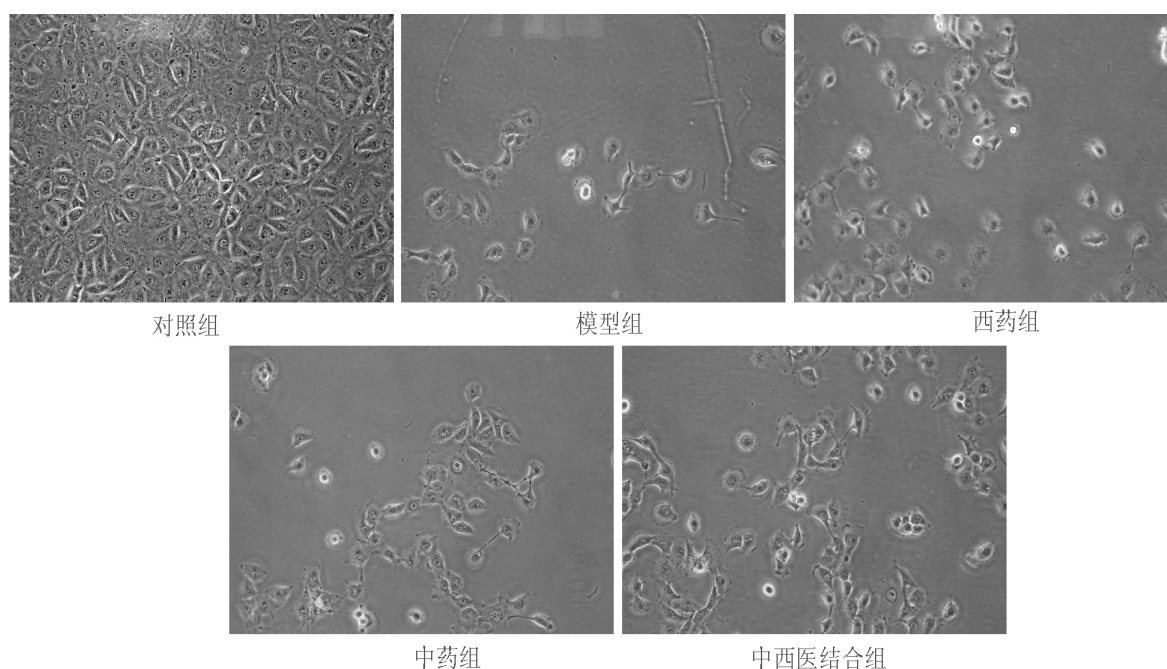


图 1 光镜下各组细胞整体形态 (×20)

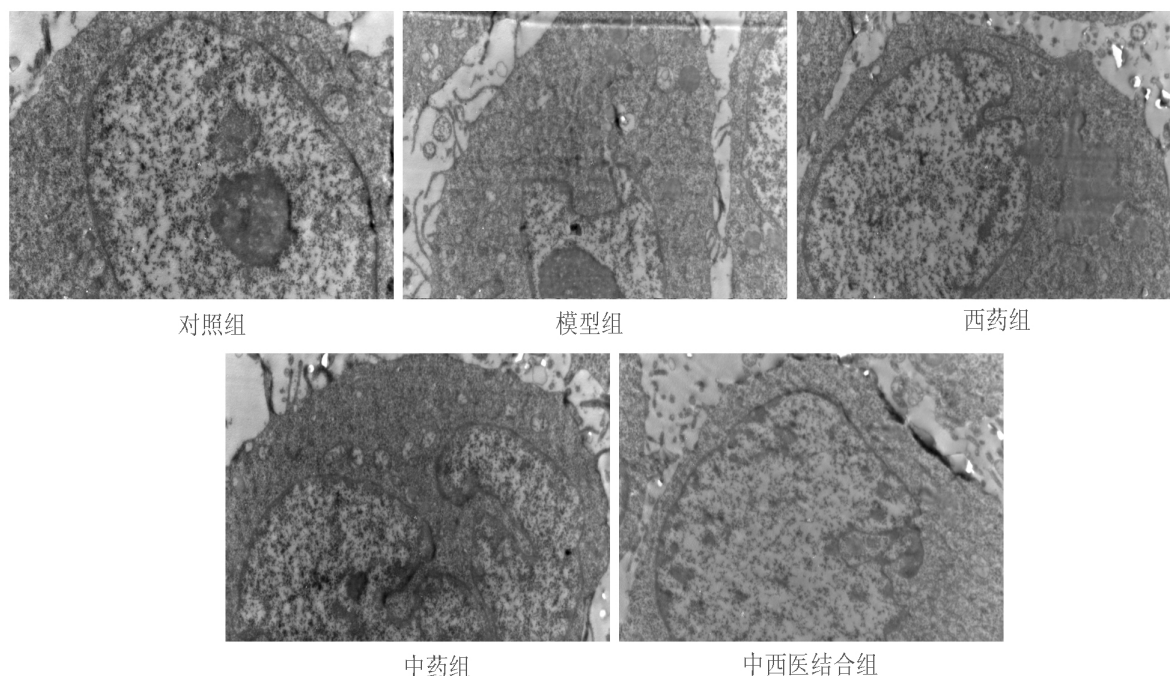


图2 透射电镜下各组细胞内超微结构 (×15000)

和西药组的细胞形态较规则,多成梭形,较模型组生长加快,形态恢复;中西医结合组细胞形态更加饱满,多成卵圆形,细胞生长加快,疏密均匀。

2.2 各组细胞内超微结构比较

图2示,对照组 HUVECs 在透射电镜下观察细胞呈现为圆形或卵圆形,形态比较规则;细胞内部可见圆形或卵圆形的细胞核,核质分布均匀、被膜略粗糙;胞浆均匀胶状、内含空泡;内质网充填于胞浆中、平行折叠成扁平管状;线粒体呈长圆短棒状、数量多且密、部分外围环绕内质网。模型组的 HUVECs 呈现明显的损伤状态,体积略不规则,可呈扁圆、蚕豆状,或有突起、内陷;细胞核不规则,核仁变小或消失,核质密集颜色深;细胞浆不均匀,核周较致密;内质网数量减少,折叠不明显;线粒体肿胀、外形不规则。西药组的 HUVECs 形态比较规则,较模型组体积稍增大,呈卵圆形;细胞核边界清晰,呈长卵圆形,胞质颜色略深于模型组;内质网体积增大、比较密集,线粒体数目明显增多。中药组和中西医结合组的 HUVECs 形态与西药组无明显差别,呈圆形或卵圆形,但单个视野中细胞体积较西药组明显增大,细胞外形规则无突起或凹陷;细胞核边界清晰,核染色质颜色较深且均匀,周围充填较多的内质网和线粒体,内质网折叠明显,线粒体饱满、数目较西药组增多。

3 讨论

冠心病属中医学“胸痹”“心痛”等范畴,冠

心病患者由于病程长、病变复杂,正气亏虚,出现心气不足或心气异常,瘀血阻滞,不通则痛,提示气虚血瘀为其基本病机^[4]。冠心病介入术患者在原病因病机基础上进行了微创手术治疗,支架植入对血管进行的扩张暂时疏通了狭窄或闭塞,但仍无力推动血液完全恢复到气血充盛、血脉通利的状态,加之机体对手术应激反应,日久血流缓慢,瘀而化热,伤阴耗气。因此,冠心病介入术相关血管内皮细胞损伤的中医病因病机为气虚血瘀夹热,临床表现复杂。中医创伤修复理论是传统中医体系中治疗外伤、应对变证等逐渐形成的理论系统,益气凉血生肌方是我们临床经验方,针对气虚血瘀夹杂热邪的病因病机而设。方中以黄芪益气生肌为君药,牡丹皮、丹参凉血活血为臣药,君臣相配则活血不伤正;金银花清热解毒为佐药,配黄芪则能将瘀热蕴结之毒托透而出。课题组前期对该方的临床研究已证实其具有降低支架植入术后再狭窄发生的趋势,并可以降低6个月时联合心血管事件发生的风险^[5]。

血管内皮细胞可以直接接触血流,能敏锐地感受到机体代谢、炎症和损伤的病理变化^[6],因此血管内皮细胞内部的显微结构变化能精确地反映其损伤情况。本实验研究发现当 Ang II 损伤 HUVECs 时,模型组细胞的体积变小、形态不规则,核染色质固缩,线粒体水肿、内质网肿胀。当加入药物血清时细胞呈现损伤修复的表现,细胞体积增大、形

态规则,细胞核边界清晰、染色质正常,内质网密集、线粒体饱满。而中药组和中西医结合组治疗的效果优于西药组,体现了益气凉血生肌方对细胞微细结构的激活和促进代谢的良性作用。

冠状动脉如果处于一个相对稳态的内环境时,内皮细胞的吸收和代谢可达到动态平衡,管壁的正常生理功能和弹性可保证心血管循环系统的顺利运行及预防动脉硬化的发生发展^[7]。本研究结果显示,中西医结合治疗可以优势互补,减少介入治疗带来的并发症,为临床应用提供更为客观而准确的证据支持。

参考文献

- [1] 农一兵,林谦,吴旻,等. 凉血生肌中药对冠状动脉介入术后再狭窄及心血管事件的干预作用[J]. 中华中医药杂志,2008,23(2):161-164.
- [2] 崔晓云,吴旻,农一兵,等. 凉血生肌方对冠心病介入术后再狭窄及心血管事件的干预[J]. 中国中西医结合杂志,2010,30(1):30-32.
- [3] Conte MS, Vanmeter GA, Akst LM, et al. Endothelial cell seeding influences lesion development following arterial injury in the cholesterol-fed rabbit[J]. Cardiovasc Res, 2002,53(2):502-510.
- [4] 夏玮. 云南地区 310 例冠心病患者 PCI 术前后中医证型的调查研究[D]. 昆明:昆明医科大学,2014.
- [5] 崔晓云. 凉血生肌法对冠脉介入术后再狭窄及心血管事件影响的临床研究[D]. 北京:北京中医药大学,2007.
- [6] 杜冠华. 血管内皮细胞损伤机制及保护药物的研究[J]. 基础医学与临床,2004,24(3):258-263.
- [7] 李冰冰,殷沈华,唐德才,等. 补气活血药含药血清对血管内皮细胞迁移的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2014,16(5):1133-1137.

The Effects of *Yiqi Liangxue Shengji Formula* (益气凉血生肌方) on Cell Morphology of Injured Vascular Endothelial Cells

SU Fei¹, SUN Yanan², CUI Xiaoyun³, LIN Qian³

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100029; 2. Medical Experimental Center, China Academy of China Medical Sciences; 3. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the mechanism of *Yiqi Liangxue Shengji Formula* in decreasing long term cardiovascular events after percutaneous coronary intervention from the view of vascular endothelial cell morphology.

Methods Randomly divided 20 rabbits into normal group, normal saline group, Chinese medicine group, western medicine group and integrat medicine group, with 4 rabbits in each group. Perfused Chinese medicine group with *Yiqi Liangxue Shengji Formula* 2.3 g/ (kg · d), western medicine group with losartan pills 0.115 g/ (kg · d), Chinese and western medicine group respectively with equal dosage of *Yiqi Liangxue Shengji Formula* and losartan pills at 30-minutes intervals. Perfused normal saline group with equal dosage of NaCl solution. No treatment was given to normal group. Collected blood sample from ear marginal veins after perfusing for 5 days continuously. Aseptically separated serum. Adopting angiotensin II (Ang II) to establish cell injury model on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), and divided them into control group, model group, Chinese medicine group, Chinese and western medicine group. Added successively corresponding 0.15 ml 15% medicated serum. Adopting inverted microscope to observe integral form changes of cells after culturing in incubator for 4 to 6 hours, and adopting transmission electron microscope to observe ultrastructure changes in cells.

Results Under optical microscope, model group cells grew more slowly with more disordered form. After medicine intervention cells grow faster with form recovering, that of Chinese medicine and western medicine group was more remarkable. By transmission electron microscope, Chinese medicine group, western medicine group, Chinese and western medicine group injured vascular endothelial cells nucleus boundary was explicit, endoplasmic reticulum increased and densified, the number of mitochondrion increased, compared with model group. Chinese medicine group, Chinese and western medicine group endoplasmic reticulum fold more obvious, mitochondrion was full, with its number was more than western medicine group.

Conclusion *Yiqi Liangxue Shengji Formula* has the function of promoting repairing the injured vascular endothelial cells in morphology. It can protect the integrity of endothelial cell, which can decrease the injury of coronary artery intervention therapy to endothelial cells.

Keywords *Yiqi Liangxue Shengji Formula* (益气凉血生肌方); vascular endothelial cells; coronary artery intervention; cell morphology

(收稿日期: 2015-03-19; 修回日期: 2015-07-01)

编辑: 邓 媛