

加味补阳还五汤对氧化型低密度脂蛋白损伤血管内皮细胞的保护作用

井汶, 吴颢昕*, 柴毅
(南京中医药大学, 南京 210046)

[摘要] **目的:**观察加味补阳还五汤(BHT)含药血清和含药血浆对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)损伤血管内皮细胞(VEC)的保护作用及机制,同时比较加味BHT含药血清和含药血浆对VEC生成影响的差异。**方法:**制备加味BHT含药血清和含药血浆,体外培养人脐静脉血管内皮细胞(HUVECs),采用ox-LDL造模,通过噻唑蓝(MTT)法观察细胞活力和Hoechst33258染色法、流式细胞术观察细胞凋亡率,并通过测定一氧化氮(NO),丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)活力,探讨加味BHT含药血清和含药血浆对ox-LDL损伤VEC的保护作用及含药血清和含药血浆之间的差异。**结果:**与空白组比较,模型组细胞死亡和凋亡率明显升高($P < 0.05$),和模型组比较,加味BHT含药血清组和含药血浆组能显著降低ox-LDL造成的HUVECs的凋亡和死亡率($P < 0.05$),细胞活性显著增强($P < 0.05$),NO含量,SOD和GPx活力显著提高,MDA含量均显著下降($P < 0.05$)。此外,含药血清组与含药血浆组比较细胞凋亡和死亡率更低($P < 0.05$),含药血浆组与含药血清组比较产生NO含量明显增加($P < 0.05$)。**结论:**加味BHT含药血清和含药血浆对于ox-LDL损伤的VEC具有一定保护作用,其机制可能与改善内皮细胞功能、抗氧化损伤、抑制细胞凋亡有关。在一定条件下对于加味BHT含药血浆保护VEC的作用强于含药血清。

[关键词] 加味补阳还五汤含药血清和含药血浆;人脐静脉血管内皮细胞;氧化型低密度脂蛋白;一氧化氮

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0128-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030128

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1603.028.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 16:03

Protective Effect of Buyang Huanwu Tang on Human Umbilical Vascular Endothelial Cells Injured by Oxidized Low Density Lipoprotein

JING Wen, WU Hao-xin*, CHAI Yi
(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects and mechanism of Buyang Huanwu Tang (BHT) on vascular endothelial cells (VEC) injured by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL), and compare the effect between drug-containing serum and drug-containing plasma on VEC. **Method:** The modified BHT-containing serum and plasma were prepared. Human umbilical vascular endothelial cells (HUVECs) were treated with serum and plasma containing modified BHT and incubated with ox-LDL for additional 24 hours for ox-LDL modeling. The cell viability was observed by MTT assay, and cells apoptosis rate was observed by using Hoechst 33258 staining and flow cytometry; meanwhile the levels of nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), and the activity of superoxidedismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) were determined to explore the difference in the protective effect between modified BHT-containing serum and plasma on injured VEC. **Result:** As compared

[收稿日期] 20160216(012)

[基金项目] 江苏省高校优势学科建设工程项目(2016-2017)

[第一作者] 井汶,在读硕士,从事中医脑病临床研究,Tel:15298380091,E-mail:jingwenonion@163.com

[通讯作者] *吴颢昕,教授,博士生导师,从事中医脑病研究,Tel:13813910523,E-mail:wuhaoxin@sohu.com

with the blank control group, the percentage of cells death and apoptosis was significantly higher in the model group ($P < 0.05$). As compared with the model group, the percentage of cells death and apoptosis was significantly reduced in modified BHT-containing serum group and plasma group ($P < 0.05$); cell viability was significantly increased ($P < 0.05$); the levels of NO, SOD and GPx were all significantly increased, the level of MDA was significantly reduced ($P < 0.05$). Besides, the percentage of cells death and apoptosis was lower in modified BHT-containing serum group than that in plasma group ($P < 0.05$); however, the level of NO in modified BHT-containing plasma group was significantly higher than that in serum group ($P < 0.05$). **Conclusion:** The serum and plasma containing modified BHT could prevent VEC from oxidative injury induced by ox-LDL, and the mechanism may be associated with improving the function of endothelial cells, anti-oxidative damage and inhibiting cell apoptosis. The protective effect of modified BHT-containing plasma on VEC was more stronger than the modified BHT-containing serum under certain conditions.

[**Key words**] serum and plasma containing modified Buyang Huanwu Tang; human umbilical vascular endothelial cells; oxidized low density lipoprotein; nitric oxide

卒中是单病种致残率最高的疾病,而动脉粥样硬化(AS)是卒中的主要原因之一。越来越多研究表明动脉粥样硬化的病理学基础是血管内皮细胞(VEC)的功能改变,其在动脉粥样硬化的发生发展和临床并发症中发挥至关重要的作用^[1]。氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)通过多种环节引起血管内皮细胞功能紊乱和结构破坏,促使动脉粥样硬化的发生^[2]。目前中医药治疗 AS 受到广泛关注,其中气虚血瘀被认为是本病发生发展的基本病因病机之一,因此作为益气活血法代表方的补阳还五汤(Buyang Huanwu Tang, BHT),临床上被广泛用于治疗脑中风等疾病,研究表明它可通过抑制氧化应激、减少细胞凋亡、下调 Rho 激酶通路并降低血脂、减轻内皮细胞损伤等多靶点发挥抗 AS 的作用^[3-5]。水蛭作为活血化瘀通络之要药,可通过减少体内脂质沉积、调节代谢紊乱、减轻氧化损伤、抑制炎症反应等环节,干预 AS 的形成^[6]。但目前关于补阳还五汤 + 水蛭的研究较少,其作用机制尚不明确,且中药复方通常仅采用血清药理学方法,具有一定局限性,因此本实验采用血清药理学和血浆药理学并举的方法,通过 ox-LDL 造成人脐静脉血管内皮细胞株(HUVECs)的凋亡和死亡模型,旨在观察加味补阳还五汤方对 ox-LDL 损伤 HUVECs 的保护作用及其机制,以期为加味补阳还五汤方治疗动脉粥样硬化提供理论依据,同时通过评价含药血清和含药血浆对 HUVECs 的影响,为血浆药理学方法提供理论支持。

1 材料

SPF 级 SD 大鼠 25 只,雄性,体重 180 ~ 200 g,购于上海西普尔一必凯实验动物有限公司,合格证

号 SCXK(沪)2013-0016。本研究所涉及的动物相关操作均在南京中医药大学动物伦理委员会的批准下进行[批准号 ACU-38(20141226)]。

HUVECs 由南京军区南京总医院肿瘤科馈赠,用高糖 DMEM 培养基[含 5% 胎牛血清(FBS),1% 青链霉素合剂]培养。补阳还五汤(黄芪 120 g,当归(全)6 g,赤芍 5 g,地龙 3 g,川芎 3 g,桃仁 3 g,红花 3 g)购自南京中医药大学国医堂,批号分别为 150201, 150213, 150201, 150103, 150205, 150301, 150301, 经南京中医药大学药学院中药鉴定教研室吴德康教授鉴定,均符合《中国药典》2015 年版要求)水煎液,终质量浓度为含生药 $1.54 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的药液,由南京中医药大学脑病实验室自制,水蛭粉(南京中医药大学国医堂,批号 150311, 鉴定信息同上)。DMEM 培养基(高糖型 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$),澳洲 FBS(美国 Gibco 公司,批号分别为 11995056, 10099141);ox-LDL(北京协生生物科技有限责任公司,原质量浓度 $1.12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$);胰蛋白酶,四甲基偶氮噻唑蓝(MTT)(Solarbio 公司,批号分别为 T1300, M8180);磷酸盐缓冲液(PBS,美国 Solarbio 公司,批号 721H024)。Hoechst 33258 染色剂,一氧化氮(NO)试剂盒(碧云天生物公司,批号分别为 C1017, S0021);AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号 CA1020);丙二醛、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 A003-1, A001-1, A005)。

SC06AD-2 型恒温 CO_2 培养箱,SL 16R 型低温超速离心机, Multiskan FC 型全自动酶标比色仪(美国 Thermo Scientific 公司);CX31 型荧光倒置显微镜

(日本 Olympus 公司), FACSEALIBUR 型流式细胞仪(美国 BD Bioscience 公司)。

2 方法

2.1 加味 BHT 含药血清和含药血浆的制备 将 25 只 SD 大鼠随机分为 2 组,①空白组 15 只(等体积生理盐水);②加味 BHT 组 10 只(补阳还五汤水煎剂 + 水蛭粉)。补阳还五汤和水蛭粉用量按“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”计算出大鼠用药量,即加味 BHT 组按 $14.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,水蛭粉 $0.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行灌胃,空白组给等体积生理盐水,2 次/d,前后间隔 4 h,连续 5 d,采血前禁食 12 h,不禁水,于末次灌胃 1 h 后,颈动脉取血,每只大鼠血液等分为 2 份,一份血液采集后室温下静置至凝固,4 °C 过夜,第 2 天在 4 °C, $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后吸取上层清液即为血清,同组血清混合,另一份血液采集在预先装好 1.5% 乙二胺四乙酸二钠(EDTANa₂)(血液-抗凝剂 9:1)离心管中,充分混匀后静置 30 min,在 4 °C, $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后吸取上层清液即为血浆,同组血浆混合,血清和血浆均在 56 °C 灭活 30 min, $0.22 \mu\text{m}$ 过滤器滤过除菌,分装后于 -80 °C 冰箱备用。

2.2 HUVECs 细胞培养 将复苏后的 HUVECs 接种于 10 cm 培养皿,用含 5% FBS 的高糖 DMEM 培养基培养,37 °C 5% CO₂ 饱和湿度下长至融合状态后(占培养皿底面的 80% 以上),消化离心后制成单细胞悬液,调整细胞密度为 1.5×10^5 个/mL,每孔 2 mL 接种于 6 孔培养板,置于 37 °C 5% CO₂ 下继续培养至细胞贴壁。

2.3 细胞分组 取对数生长期的 HUVECs 按照 2.2 项步骤接种于 6 孔培养板内,待细胞贴壁后吸弃上清,进行分组,共分为 6 组,①空白血清组(5% 空白血清);②模型组(ox-LDL + 5% 空白血清);③加味 BHT 含药血清组(5% 含药血清 + ox-LDL);④空白血浆组(5% 空白血浆);⑤模型组(ox-LDL + 5% 空白血浆);⑥加味 BHT 含药血浆组(5% 含药血浆 + ox-LDL)。其中①,②,④,⑤ 给予相应 5% 空白血清或空白血浆 1 mL,③,⑥ 给予 5% 加味 BHT 含药血清或血浆 1 mL,预处理 24 h 后各组吸弃上清,①,④ 给予含 1% FBS 的高糖 DMEM 培养基 1 mL,②,③,⑤,⑥ 给予终质量浓度为 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ox-LDL 1 mL,刺激 24 h(ox-LDL 刺激时间和浓度为预实验结果)后进行各项指标检测。

2.4 加味 BHT 含药血清和含药血浆对 ox-LDL 损伤 HUVECs 活力的检测

2.4.1 加味 BHT 含药血清对 ox-LDL 损伤 HUVECs 细胞活力的检测 取对数生长期的 HUVECs,调整细胞密度为 4×10^4 个/mL,每孔 100 μL 接种于 96 孔板,置于 37 °C 5% CO₂ 的培养箱培养至细胞贴壁,实验分组为正常组、空白组、模型组、加味 BHT 含药血清组。正常组给予含 1% FBS 的高糖 DMEM 培养基 100 μL ,空白组和模型组给予用 1% FBS 的高糖 DMEM 稀释的空白血清 100 μL ,加味 BHT 含药血清组给予用 1% FBS 的高糖 DMEM 培养基稀释的加味 BHT 含药血清 100 μL ,置于 37 °C 5% CO₂ 中预处理 24 h 后各组吸弃上清,正常组、空白组给予含 1% FBS 的高糖 DMEM 培养基 100 μL ,模型组和药物组给予 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 ox-LDL 100 μL ,刺激 24 h 后各组细胞吸弃上清,均加入含 1% FBS 的高糖 DMEM 培养基 100 μL 和 MTT 溶液 20 μL 在 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中避光孵育 4 h,弃上清,加入二甲基亚砷(DMSO) 150 μL ,摇床低速震荡 20 min,酶标仪 492 nm 检测各孔的吸光度 A。其中为避免大鼠空白血清、血浆或其他因素的影响,不同浓度的药物组设置与之相应浓度的空白组和模型组。根据加味 BHT 含药血清浓度的不同,每组再分为 3.5%, 5%, 7.5% 血清组(浓度梯度根据预实验结果选定)。每组设 6 个复孔,另设调零孔(仅加入相应培养基,无细胞),实验重复 3 次。

细胞存活率 = 模型组 A 或药物组 A / 正常组 A × 100%

2.4.2 加味 BHT 含药血浆对 ox-LDL 损伤 HUVECs 细胞活力的检测 步骤同 2.4.1 项,将相应的空白血清或加味 BHT 含药血清换成空白血浆或者加味 BHT 含药血浆即可。

2.5 Hoechst33258 染色 按 2.3 项方法对细胞进行分组及处理后弃去上清液,预冷的 PBS 洗涤 2 次后,每孔加入 4% 多聚甲醛溶液 1 mL 固定在 4 °C, 30 min,用 PBS 清洗 2 次,每次 3 min,室温下加入 Hoechst33258 荧光染料(每孔 Hoechst33258 染色液 500 μL 和 PBS 500 μL),置于摇床上避光染色 10 min 后弃去染色液,PBS 清洗 2 次,每次 3 min,避光,荧光显微镜观察并摄片。其中荧光显微镜的紫外激发波长为 350 nm,发射波长 460 nm。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡 按 2.3 项方法收集各组细胞,1 000 g 离心 5 min,弃上清,用 PBS 重悬细胞并进行细胞计数,取 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ 个/mL 细胞,在 4 °C, 1 000 g 离心 5 min,弃上清,加入预冷的 PBS 1 mL,在 4 °C, 1 000 g 离心 5 min,弃上清,重复洗涤 2 次,每管加入 Binding Buffer 200 μL ,

Annexin V-FITC 10 μL 和 PI 10 μL , 轻轻混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后每管加入 Binding Buffer 300 μL , 在 1 h 内流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.7 NO, MDA 含量及 SOD, GPx 活力的测定 分组、造模及给药方法同 2.3 项。直接吸取上清液, 2 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 吸取上清液为细胞上清液, 各组细胞经过消化、离心、洗涤、重悬于 PBS 中, 采用超声破碎法制备成细胞裂解液, 根据试剂盒方法, 检测细胞上清液中 NO 含量, GPx 活力及细胞裂解液中 MDA 含量, SOD 活力。

2.8 统计学处理 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理, 计量数据资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异比较用 t 检验, 多组间差异比较采用方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 加味 BHT 含药血清和含药血浆对 ox-LDL 损伤的 HUVECs 细胞活力影响 与同浓度的空白组比较, ox-LDL 模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.01$), 与同浓度的模型组比较, 加味 BHT 含药血清组细胞活力均显著提升 ($P < 0.01$), 加味 BHT 含药血浆组在体积分数为 3.5%, 5% 时细胞活力显著升高 ($P < 0.01$), 而 7.5% 加味 BHT 含药血浆组细胞活力与相应模型组比较无明显统计学差异, 可能过高浓度的大鼠血浆对细胞生长有一定毒性, 因此选取对细胞生长影响较小的 5% 加味 BHT 含药血清和含药血浆作为工作浓度进行之后的实验。此外, 同等浓度含药血清组较含药血浆组细胞活力更高 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 加味 BHT 含药血清、血浆对 ox-LDL 损伤的 HUVECs 细胞凋亡的影响 正常组细胞的细胞核呈弥散均匀荧光, 空白血清、空白血浆组和正常组相似, 而模型组细胞的细胞核出现形状不规则或者部分染色质聚合和分裂, 在荧光显微镜下可见浓染致密的颗粒块状荧光, 用加味 BHT 含药血清和含药血浆预处理的细胞大部分细胞核和染色质与空白组相似。见图 1。

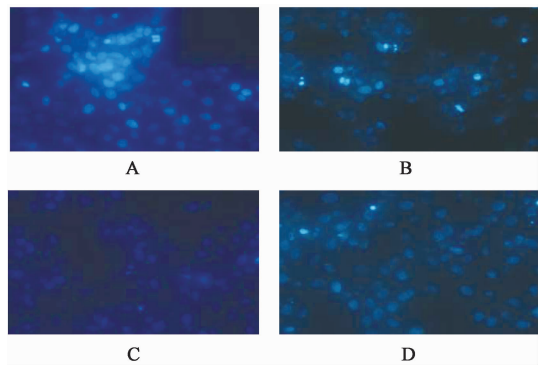
3.3 加味 BHT 含药血清、血浆对 HUVECs 细胞的影响 与空白血清组比较, ox-LDL (空白血清) 组的细胞凋亡和死亡率明显提高 ($P < 0.01$), 而加味 BHT 含药血清组比模型组细胞凋亡和死亡率明显下降 ($P < 0.01$)。同样, 与空白血浆组比较, ox-LDL (空白血浆) 组细胞凋亡和死亡率较空白血浆组明显提高 ($P < 0.01$), 而加味 BHT 含药血浆组的细胞凋亡和死亡率比模型组明显下降 ($P < 0.01$)。此

表 1 加味 BHT 含药血清和含药血浆对 ox-LDL 损伤 HUVEC 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of modified BHT-containing serum and plasma on HUVECs cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	血清体积分数 / %	血清	血浆
空白	3.5	0.825 \pm 0.026	0.582 \pm 0.020
	5	0.995 \pm 0.020	0.706 \pm 0.022
	7.5	0.989 \pm 0.019	0.705 \pm 0.024
模型	3.5	0.538 \pm 0.013 ²⁾	0.421 \pm 0.015 ²⁾
	5	0.496 \pm 0.022 ²⁾	0.424 \pm 0.020 ²⁾
	7.5	0.529 \pm 0.012 ²⁾	0.531 \pm 0.019 ²⁾
加味 BHT	3.5	0.648 \pm 0.016 ⁴⁾	0.572 \pm 0.025 ^{4,5)}
	5	0.724 \pm 0.011 ⁴⁾	0.617 \pm 0.019 ^{4,5)}
	7.5	0.624 \pm 0.012 ⁴⁾	0.502 \pm 0.018 ⁵⁾

注: 与同浓度的空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与同浓度的模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$; 与同浓度含药血清组比较⁵⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。



A. ox-LDL (空白血清组); B. ox-LDL (空白血浆组); C. 加味 BHT 含药血清组; D. 加味 BHT 含药血浆组

图 1 加味 BHT 含药血清、血浆对 ox-LDL 损伤的 HUVECs 细胞凋亡的影响 (Hoechst 33258, $\times 40$)

Fig. 1 Effect of modified BHT-containing serum and plasma on ox-LDL damage of HUVECs apoptosis (Hoechst 33258, $\times 40$)

外, 含药血清组细胞凋亡和死亡率与含药血浆组比较明显偏低 ($P < 0.05$)。见图 2。

3.4 加味 BHT 含药血清和含药血浆对 ox-LDL 损伤 HUVECs 的 NO, MDA 含量和 SOD, GPx 活力的影响 与空白组比较, 模型组细胞上清液中 NO 含量、细胞裂解液中 SOD, GPx 活力下降, 而细胞裂解液中 MDA 含量增高 (均 $P < 0.05$)。与模型组相比, 加味 BHT 含药血清和含药血浆组均 NO 含量和 SOD, GPx 活力均显著提高, 同时 MDA 含量降低, 具有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。此外, 含药血浆组与相应含药血清组比较产生 NO 含量明显增加 ($P < 0.05$), 两者对 MDA 含量, SOD, GPx 活力影响无明显统计学差异。见表 2。

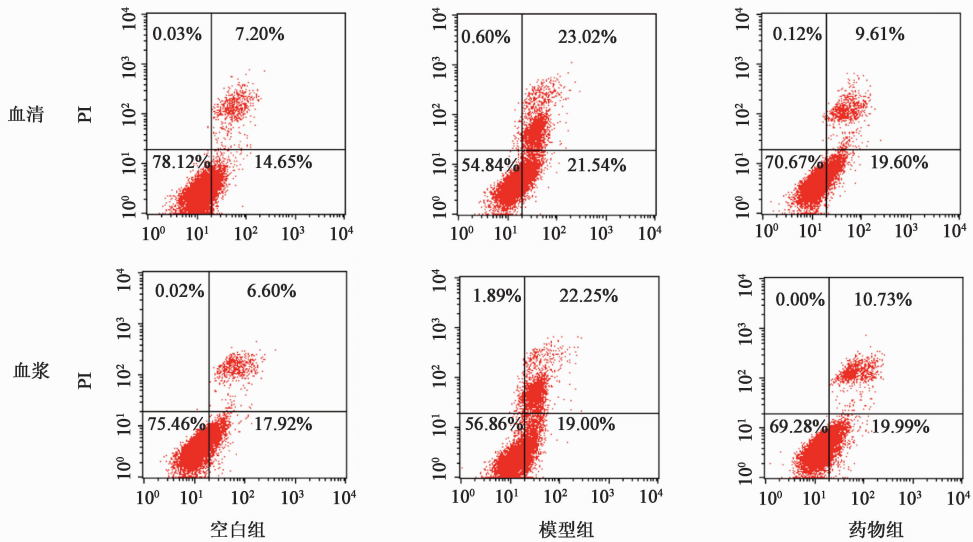


图 2 加味 BHT 含药血清、血浆对 HUVECs 细胞的影响 (Anmexin V/PI)

Fig. 2 Effect of modified BHT-containing serum and plasma on HUVECs (Anmexin V/PI)

表 2 加味 BHT 含药血清和含药血浆对 ox-LDL 损伤 HUVECs 的 NO, MDA, SOD, GPx 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of modified BHT-containing serum and plasma on levels of NO, MDA, SOD and GPx ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

成分	组别	给药浓度	NO/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD/U $\cdot \text{mL}^{-1}$	GPx/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
血清	空白	5%	5.354 ± 0.009	0.022 ± 0.010	24.110 ± 0.162	9.876 ± 1.970
	ox-LDX	150 mg·L ⁻¹	3.859 ± 0.013 ²⁾	0.048 ± 0.003 ¹⁾	19.770 ± 0.198 ²⁾	3.670 ± 0.811 ¹⁾
	药物	5%	4.428 ± 0.007 ⁴⁾	0.029 ± 0.002 ⁴⁾	21.040 ± 0.092 ⁴⁾	7.839 ± 1.584 ³⁾
血浆	空白	5%	5.460 ± 0.007	0.022 ± 0.008	23.610 ± 0.129	10.790 ± 1.191
	ox-LDX	150 mg·L ⁻¹	3.922 ± 0.004 ²⁾	0.053 ± 0.002 ¹⁾	19.930 ± 0.135 ²⁾	4.409 ± 2.284 ¹⁾
	加味 BHT	5%	4.467 ± 0.003 ^{4,5)}	0.034 ± 0.002 ⁴⁾	21.420 ± 0.111 ⁴⁾	8.978 ± 1.524 ³⁾

注:给药剂量按照试剂盒方法加入。

4 讨论

对于 AS 的机制,早在 1999 年 Ross 就明确提出“AS 是一种炎症性疾病”,指出 AS 的发生是由于血管内皮细胞和平滑肌细胞受到各种危险因素,特别是 ox-LDL 的损伤,使血管局部产生的过度的慢性炎症增生反应^[7]。研究表明 ox-LDL 是导致 AS 的主要因素之一,所以选用 ox-LDL 损伤血管内皮细胞作为病理模型进行研究。从研究方法来看,目前中医药复方研究常用的是血清药理学实验,但其存在一定的局限性,于是血浆药理学应运而生,有人认为血浆的组成较血清能更好的反应体内的实际情况,应采用含药血浆和含药血清并举的方法来排除凝血及相关过程与抗凝剂带来的影响,从而得出可靠结论^[8-11]。本研究基于此理论采取血清药理学和血浆药理学并举的方法进行研究,平行观察加味 BHT 含药血清和含药血浆对 HUVECs 的影响,以论证实验结果的可靠性,同时为血浆药理学的应用提供理论支持。

补阳还五汤出自王清任的《医林改错》,作为益气活血的代表方,方中重用黄芪以补益元气,气旺则血行,血行则瘀去络通,为君药。当归长于活血通络,为臣药。赤芍、川芎、桃仁、红花共同协同当归以活血祛瘀。地龙通经活络,力专而善行全身,以行药力,亦为佐药。由于血瘀是大多老年病的病机之一,其瘀血范围广泛且瘀深难化,而补阳还五汤益气有余而活血之力较弱,因此增用水蛭研粉吞服以加强活血化瘀之力。水蛭专入肝经,长于破血通经而不伤新血。在服药方法方面,选择水蛭研粉吞服而非入水煎剂的原因是根据临床导师用药经验发现水蛭粉装胶囊吞服效果较入水煎剂更佳且易于服用,研究也表明 1/2 普通水蛭散剂在抗凝、抗血栓作用上优于水蛭段煎剂^[12],从而佐证了研粉吞服的可靠性。补阳还五汤 + 水蛭诸药共用,则益气 and 活血并重,使气充瘀去络通。

本实验结果表明 ox-LDL 可导致 HUVECs 的凋亡和死亡,加味 BHT 含药血清和含药血浆均能明显

降低细胞凋亡和死亡率。含药血清组与含药血浆组比较能明显降低细胞凋亡率,这可能是因为血清本身较血浆更能促进增殖作用,因此血清本身的生物活性可能干扰药理效应。NO 作为血管内皮细胞分泌的主要扩血管物质,当内皮功能受损后,NO 生物利用率降低,依赖 NO 舒张血管从而发挥抗 AS 的作用减弱,因此着手于调整 NO 的生物利用度,包括促进生成增加、破坏减少或利用增加是改善血管内皮细胞功能的主要措施之一。本实验发现加味 BHT 含药血清和含药血浆均能增加 NO 含量,证明其能降低 ox-LDL 对 HUVECs 的损伤,改善受损内皮细胞的状态。MDA 是脂质过氧化的代谢产物,其水平的高低可反应脂质过氧化损伤的程度。SOD 对机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用,可清除氧自由基,保护细胞免受损伤,其活力的高低可反应机体清除氧自由基能力。GPx 可以特异的催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应,起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。本实验发现 ox-LDL 损伤 HUVECs 时 MDA 含量明显升高,SOD 活力下降,细胞上清液中 GPx 活力下降,提示 ox-LDL 对 HUVECs 有氧化损伤,加味 BHT 含药血清和含药血浆能明显降低 ox-LDL 损伤 HUVECs 的 MDA 含量,提高 SOD 和 GPx 活力,表明加味 BHT 含药血清和含药血浆可以减轻 ox-LDL 对 HUVECs 的氧化损伤作用。此外,加味 BHT 含药血清和含药血浆对 ox-LDL 损伤 HUVECs 的保护作用及引起相应活性成分变化的方向性一致,表明实验结果可靠。但是,含药血浆组较含药血清组比较产生 NO 含量明显增加,造成这种含药血清和含药血浆活性成分之间的差异可能是由于抗凝剂干预、灭活的预处理、凝血过程中的一系列反应综合的结果。但是由于 BHT 加味含药血浆组刺激 NO 生成含量较含药血清组明显升高,因此在一定程度上加味 BHT 含药血浆优于含药血清,在后续实验中可以优先选择含药血浆进行实验。

综上所述,加味补阳还五汤方对于 ox-LDL 损伤的血管内皮细胞具有保护作用,其机制可能与改善内皮细胞功能、抗氧化损伤、抑制细胞凋亡有关,但 ox-LDL 作用于血管内皮细胞的分子机制以及加味补阳还五汤方能够抑制细胞凋亡,改善内皮细胞功能的具体分子机制,还有待进一步研究。同时,从本实验研究结果看,在一定程度上血浆药理学方法可能优于血清药理学方法,但鉴于本实验仅以加味补阳还五汤为对象进行了简单生化水平比较,对其

药效成分的定性、定量及造成差异的机制仍需进一步研究。此外本实验仅选择了 EDTANa₂ 作为抗凝剂,对于其他抗凝剂可能得出的结论尚不能确定,并且在含药血清和含药血浆的制备中采用了灭活预处理,对此过程中可能对实验结果引起的影响也不能确定,这还有待进一步研究深化。

[参考文献]

- [1] Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? [J]. Circulation, 2004, 109(21): 1127-1133.
- [2] LI D, CHEN H, Romeo F, et al. Statins modulate oxidized lowdensity lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells:role of LOX-1[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 302(2): 601-605.
- [3] 邱顺辉,章常华,高书亮,等. 补阳还五汤抗动脉粥样硬化与间隙连接蛋白关系的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 161-164.
- [4] 张红珍,李丽,焦瑞,等. 补阳还五汤对动脉粥样硬化模型大鼠主动脉 Rho 激酶及 NF- κ B p65 mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(12): 1495-1499.
- [5] 刘志勇,游宇,易文凤,等. 补阳还五汤通过调节 HUVEC 细胞 Rho/Rho 激酶信号通路作用于动脉粥样硬化的研究[J]. 中国新药与临床药理, 2015, 26(5):595-600.
- [6] 高丽娟,高娟,胡耀红,等. 水蛭粉对高脂血症大鼠动脉粥样硬化形成过程的干预机制[J]. 中成药, 2014, 36(9): 1962-1965.
- [7] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-126.
- [8] Kim H J, Kim M R, So E J, et al. Comparison of proteomes in various human plasma preparations by two-dimensional get electrophoresis[J]. J Biochem Biophys Methods, 2007, 70(4): 619-625.
- [9] 贺石林,葛金文. 正确选择血标本的思考[J]. 诊断学理论与实践, 2005, 4(6): 433-434.
- [10] Teahan O, Gamble S, Holmes E, et al. Impact of analytical bias in metabolomic studies of human blood serum and plasma[J]. Anal Chem, 2006, 78(13): 4307-4318.
- [11] 葛金文,朱慧斌,王宇红,等. 关于中药血清药理学方法的再思考[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2008, 10(6): 16-22.
- [12] 侯丕华,吴玉为. 活血化痰在老年病治疗中的运用[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(5): 409-411.

[责任编辑 邹晓翠]