

四妙勇安汤含药血清对高糖/高胰岛素诱导的兔 VSMC 增殖的影响及其机制

于洪静¹, 李秋梅^{2*}, 张宝文¹, 姜玫²

(1. 大连大学, 辽宁 大连 116622; 2. 大连大学附属新华医院内分泌科, 辽宁 大连 116600)

[摘要] 目的: 研究四妙勇安汤含药血清对高糖/高胰岛素诱导的兔血管平滑肌细胞(VSMC)增殖的影响及其作用机制。方法: 9 只新西兰大白兔随机分为 3 组, 每组 3 只, 分别给予蒸馏水 10 mL/次, 2 次/日; 辛伐他汀 5 mg·kg⁻¹, 1 次/日; 四妙勇安汤按生药量 11.25 g·kg⁻¹, 2 次/日, 连续 3 d, 血清药理学方法制备含药血清, 高糖/高胰岛素(4 500 mg·L⁻¹葡萄糖 + 100 U·L⁻¹胰岛素)诱导兔 VSMC 增殖, 实验分为空白组(10% FBS 的正常 DMEM)、正常组(10% FBS 的正常 DMEM + 5% 正常血清)、模型组(10% FBS 的高糖 DMEM + 100 U·L⁻¹胰岛素 + 5% 正常血清)、西药组(10% FBS 的高糖 DMEM + 100 U·L⁻¹胰岛素 + 5% 辛伐他汀血清)、中药组(10% FBS 的高糖 DMEM + 100 U·L⁻¹胰岛素 + 5% 四妙勇安汤血清), 四唑盐比色(MTT)法检测细胞增殖, 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测细胞培养上清液中白介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子(TNF- α)的含量。结果: 高糖/高胰岛素可诱导 VSMC 增殖, 与正常组比较模型组 MTT 的吸光度(A)、细胞培养上清液 IL-6, TNF- α 的含量显著升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 中药组、西药组均能降低 MTT 的 A、细胞培养上清液 IL-6 和 TNF- α 的含量($P < 0.05$)。结论: 四妙勇安汤对高糖高胰岛素诱导的平滑肌细胞增殖有一定的抑制作用, 其机制之一可能与减少 IL-6 和 TNF- α 分泌有关。

[关键词] 四妙勇安汤; 高糖高胰岛素; 平滑肌细胞; 增殖; 白介素-6; 肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)17-0251-04

[doi] 10.11653/syjf2013170251

Anti-proliferative Effects and Mechanisms of Serum Containing Simiao Yongan Decoction on Rabbit Aortic Smooth Muscle Cells During the Insulin Resistance State

YU Hong-jing¹, LI Qiu-mei^{2*}, ZHANG Bao-wen¹, JIANG Mei²

(1. Dalian University, Dalian 116622, China;

2. Affiliated Xinhua Hospital of Dalian University, Dalian 116600, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the anti-proliferative effects and possible mechanisms of serum containing Simiao Yongan decoction (SYD) on rabbit aortic smooth muscle cells (VSMC) during the insulin resistance state. **Method:** Nine New Zealand big-eared rabbits were randomly divided into 3 groups with 3 rabbits each group. Each groups were separately given distilled water 10 mL, simvastatin 5 mg·kg⁻¹ and SYD at dosage of 11.25 g·kg⁻¹ each time and twice a day for 3 consecutive days. Serum containing SYD was prepared by serum pharmacological method, the proliferation of VSMC was induced by high concentrations of glucose and insulin (4 500 mg·L⁻¹ glucose + 100 U·L⁻¹ insulin). The VSMCs were divided into following groups: blank group (10% FBS normal glucose DMEM), normal group (10% FBS normal glucose DMEM + normal serum containing),

[收稿日期] 20130224(003)

[基金项目] 辽宁省教育厅科学技术研究(2008054)

[第一作者] 于洪静, 硕士研究生在读, 从事糖尿病大血管病变的中西医结合防治研究, Tel: 18004092787, E-mail: hongjingy2010@126.com

[通讯作者] *李秋梅, 副教授, 博士, 从事糖尿病大血管病变的中西医结合防治研究, Tel: 13889516601, E-mail: lqm5800@sina.com

model group (10% FBS glucose DMEM + 100 U · L⁻¹ insulin + normal serum containing), western medicine group (10% FBS high glucose DMEM + 100 U · L⁻¹ insulin + serum containing simvastatin), traditional Chinese medicine group (10% FBS high glucose DMEM + 100 U · L⁻¹ insulin + serum containing SYD). Cell proliferation was measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, content of IL-6 and TNF- α in cell culture supernatant was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method. **Result:** The proliferation of VSMC was markedly induced by high concentrations of glucose and insulin. Compared with the normal group, the absorbance (A) value of MTT, the content of cell culture supernatant of IL-6 and TNF- α in model group was increased significantly ($P < 0.05$); compared with the model group, Chinese medicine group and western medicine group, the A value, the content of IL-6 and TNF- α of cell culture supernatant was reduced ($P < 0.05$). **Conclusion:** Serum containing SYD can inhibit proliferation of the smooth muscle cells induced by high glucose and insulin, one of the possible mechanisms may be related to reducing secretion of IL-6 and TNF- α in smooth muscle cells.

[**Key words**] Simiao Yongan decoction; vascular smooth muscle cells; proliferation; interleukin-6; tumor necrosis factor- α

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的异常增殖是高血压、血管动脉粥样硬化病变的共同病理基础,胰岛素抵抗 (IR) 是导致 VSMC 增殖的重要原因。四妙勇安汤由玄参、当归、金银花、甘草组成,为治疗脱疽的名方,在抗炎、调节血脂、扩张动脉血管、改善血液流变学状态等方面具有独特而肯定的疗效^[1-3]。本研究以兔胸主动脉平滑肌细胞为对象,探讨四妙勇安汤对高糖/高胰岛素诱导 VSMC 增殖的影响及其作用机制。

1 材料

1.1 动物及细胞 新西兰大耳白兔 9 只,体重 (2.0 ± 0.1) kg,均为雄性,大连医科大学动物中心提供,许可证号 SCXK(辽)2008-0002。兔胸主动脉平滑肌细胞株购自北京协和细胞中心(资源编号 3111C0001CCC000066)。

1.2 药物及试剂 辛伐他汀(批号 100257,杭州默沙东制药有限公司,动物给药量 5 mg · kg⁻¹) 四妙勇安汤煎剂(所用中药材均购自大连大学医学院中药教研室,经中药学院主管药师高明鉴定,其原植物分别为金银花 *Lonicerae Japonicae Flos*, 玄参 *Scrophulariae Radix*, 当归 *Angelicae Sinensis Radix*, 甘草 *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*。按原方比例(金银花 30 g, 玄参 30 g, 当归 20 g, 甘草 10 g)配齐药物,汤液经旋蒸仪旋蒸浓缩至含生药 2.25 g · mL⁻¹; 高糖 DMEM、低糖 DMEM (Hyclone 公司), 噻唑蓝 (MTT, Sigma 公司), 白介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) ELISA 试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。

1.3 仪器 NV-4750E 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 NUAIRE 公司) IX-41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公

司) ELx800 型酶联免疫检测仪(美国 Bio Tec 公司)。

2 方法

2.1 含药血清制备 根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”,本实验按动物与用人药量体表面积折算系数 15 换算给药。将 9 只新西兰大耳白兔随机分为 3 组,每组 3 只,分别给予蒸馏水 10 mL/次,2 次/日;辛伐他汀 5 mg · kg⁻¹ ig,1 次/日;四妙勇安汤按生药量 11.25 g · kg⁻¹ ig,2 次/日,连续 3 d^[4]。于末次给药 2 h 后心脏采血,以 3 000 r · min⁻¹ 离心 5 min 后分离血清,合并同组含药血清,0.22 μ m 微孔滤膜过滤后, - 80 °C 保存备用。

2.2 分组 高糖/高胰岛素培养基模拟 IR 状态,本实验用高糖/高胰岛素诱导 VSMC 增殖^[5],5% 浓度的动物血清进行实验^[6],即用 DMEM 培养基将上述各组动物血清稀释成 5% 的浓度加入培养板中。分为空白组(10% FBS 的正常 DMEM)、正常组(10% FBS 的正常 DMEM + 正常血清)、模型组(10% FBS 的高糖 DMEM + 100 U · L⁻¹ 胰岛素 + 蒸馏水血清)、西药组(10% FBS 的高糖 DMEM + 100 U · L⁻¹ 胰岛素 + 辛伐他汀血清)、中药组(10% FBS 的高糖 DMEM + 100 U · L⁻¹ 胰岛素 + 四妙勇安汤血清)。正常 DMEM 含 1 000 mg · L⁻¹ 葡萄糖,高糖 DMEM 含 4 500 mg · L⁻¹ 葡萄糖。

2.3 指标检测 兔胸主动脉平滑肌细胞株在含 10% 胎牛血清和正常 DMEM,37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 d 更换培养液。取生长状况良好的兔 VSMC,用含 0.25% -EDTA 的胰蛋白酶消化后,以含 10% 胎牛血清的正常 DMEM 将细胞稀释至 3 × 10⁴ /

mL,将细胞接种于 96 孔培养板中,培养 24 h,倒置显微镜下观察待细胞长成次融合状态时,换以含 0.5% 胎牛血清的正常 DMEM 继续培养 12 h,使细胞同步化于 G₀/G₁ 期。随后将 96 孔板分为空白组、正常组、模型组、西药组、中药组,每组 8 个复孔,每孔液体总体积为 100 μ L。继续培养 24 h 后,①收集细胞培养上清液,用 IL-6 和 TNF- α 的 ELISA 试剂盒检测其相应含量;②MTT 比色法检测细胞增殖,即加入 MTT 20 μ L(5 g·L⁻¹,PBS 配制),微振荡混匀,放回 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中继续培养 4 h 后,吸弃培养上清液,加入 DMSO 150 μ L,振荡混匀 10 min 后于酶标仪 570 nm 波长测吸光度(A)。

2.4 统计方法 采用 SPSS 17.0 统计分析软件,均数间经方差齐性检验后,数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

表 1 各药物血清对 VSMC 增殖、IL-6、TNF- α 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	药物血清终浓度/%	细胞增殖/A	IL-6/ng·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹
空白	-	0.77 \pm 0.05	697.54 \pm 67.49	778.30 \pm 48.20
正常	5	0.80 \pm 0.03	745.23 \pm 89.27	768.40 \pm 72.80
模型	5	1.18 \pm 0.13 ¹⁾	1 168.74 \pm 139.16 ¹⁾	1 225.56 \pm 149.47 ¹⁾
辛伐他汀	5	0.95 \pm 0.11 ¹⁾	895.94 \pm 43.50 ^{1,2)}	940.58 \pm 49.30 ^{1,2)}
四妙勇安汤	5	0.88 \pm 0.44 ^{1,2)}	813.91 \pm 49.45 ^{1,2)}	849.54 \pm 43.10 ^{1,2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与辛伐他汀组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

自 Ross 教授在其损伤反应学说基础上明确提出了“动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种炎症性疾病”^[7]这一观点以来,很多基础和临床研究也都证实了 AS 具有慢性炎症的病理过程,炎症反应始终伴随着其发生发展过程^[8],且炎症因子可以从多个靶点引发和参与 AS 发病,并在其病程进展中起重要作用。

四妙勇安汤出自清代医家鲍相璈《验方新编》,由金银花、元参、当归、甘草 4 味药组成,以金银花清热解毒,玄参滋阴凉血清热共为君药,当归养血活血、化瘀散结为臣,甘草为使调和诸药,全方具有清热解毒,滋阴养血、活血化瘀功效,主治脱疽症,即现代医学中的血栓闭塞性脉管炎或动脉硬化性闭塞症等病变。现代药理学研究发现,四妙勇安汤中金银花的主要活性成分绿原酸,有显著的抗菌消炎、抗氧化、抗肿瘤等作用^[9-10];当归的活性成分阿魏酸,具有明显的抗炎作用^[11-12];玄参中的环烯醚萜类成分有抗病毒、抗氧化、增强免疫等作用^[13-14]。动物实验表明^[15]四妙勇安汤有降低动脉粥样硬化家兔血

3 结果

3.1 各药物血清对兔 VSMC 增殖的影响 通过 MTT 检测结果可见,空白组与正常组两组间 A 未见明显差异,说明灌胃蒸馏水的兔含药血清对 VSMC 无显著影响;与正常组比较,模型组、西药组、中药组 A 均有显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,西药组、中药组 A 明显降低($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 各药物血清对兔 VSMC 培养上清液 IL-6、TNF- α 含量的影响 正常组与空白组比较 IL-6、TNF- α 含量未见明显差异;与正常组比较,模型组、西药组、中药组 IL-6、TNF- α 含量均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,西药组、中药组 IL-6、TNF- α 含量显著降低($P < 0.05$);而中药组比西药组 TNF- α 含量明显降低($P < 0.05$),两组间 IL-6 含量则未见显著差异。见表 1。

清炎症因子水平、稳定动脉粥样硬化易损斑块等作用;离体研究进一步表明四妙勇安汤含药血清在正常培养条件下可以促进 ECV304 细胞的增殖;在炎症损伤刺激下,可抑制内皮细胞 IL-8、TNF- α 、MCP-1 分泌,起到抑制内皮细胞异常增殖、保护血管内皮细胞的作用^[16]。AS 发生发展由内皮细胞、单核/巨噬细胞、血管平滑肌细胞等多种细胞成分及细胞因子参与的复杂过程,且 VSMC 异常增殖导致的血管壁狭窄是引发 AS 的重要病理基础。然查阅文献发现,目前尚未有四妙勇安汤对 VSMC 增殖影响的相关报道。本课题即以 VSMC 为研究对象,探讨四妙勇安汤对高糖/高胰岛素诱导 VSMC 增殖的影响,以期更好的阐述四妙勇安汤对抗 AS 的作用机制。

相关研究表明,作为治疗高胆固醇血症的他汀类药物具有抗炎、抗氧化、抑制 VSMC 增殖等多种作用^[17],因此本实验以辛伐他汀作为对照组来研究四妙勇安汤对 VSMC 增殖的作用影响。研究表明,四妙勇安汤含药血清可使高糖高胰岛素刺激致 A 下降,与辛伐他汀结果相当,表明其抗动脉粥样硬化作用的途径之一是通过抗平滑肌细胞增殖、减轻血管

狭窄来实现的。本研究结果还证实了四妙勇安汤抗动脉粥样硬化作用机制体现在抗炎性因子分泌方面的作用。可以看到该药可降低 VSMC 增殖细胞培养上清中 IL-6 和 TNF- α 的含量 ($P < 0.05$); 且在降低细胞上清液 TNF- α 的含量方面, 中药组优于辛伐他汀 ($P < 0.05$)。IL-6 又称前炎症因子, 可通过激活巨噬细胞加速脂质的沉积、促进单核细胞进入血管内皮下参与斑块的形成, 也可通过刺激斑块中平滑肌细胞的增殖, 从而导致斑块破裂, 使胶原基质和脂质核心裸露, 导致动脉粥样硬化的发生^[18]。TNF- α 主要由活化的单核巨噬细胞产生, 能抑制 NO 合成酶的活性、诱导血管内皮细胞的凋亡^[19]; 另外, TNF- α 能减少过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ) 的表达, 抑制 PPAR- γ 的活性, 引起胰岛素抵抗和血管病变^[20]。

本实验从细胞学研究角度首次证实了四妙勇安汤对高糖/高胰岛素诱导 VSMC 增殖有明显的抑制作用, 其作用机制之一为降低 IL-6 和 TNF- α 炎症因子分泌。中药复方的作用方式是多靶点、多层次的整体调节, 四妙勇安汤对于 VSMC 增殖的抑制作用, 除抑制细胞内炎症因子分泌外, 是否还调节着细胞外基质分泌等机制还有待于下一步的研究。

[参考文献]

[1] 吕延伟, 袁明殿, 郑巧楠, 等. 金银花当归配伍对实验性腹主动脉瘤大鼠血清中炎症介质的影响及其意义[J]. 实用中医内科杂志, 2008, 22(11): 3.

[2] 王文英, 戴莲仪, 简小兵. 四妙勇安汤对糖尿病周围神经病变患者血液流变学的影响[J]. 实用中医内科杂志, 2006, 20(3): 302.

[3] 朱寅圣. 四妙勇安汤合生脉饮治疗冠心病 120 例[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(11): 2824.

[4] 许颖智, 张军平, 李明, 等. 四妙勇安汤对实验性动脉粥样硬化易损斑块内血管新生的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18(2): 161.

[5] Trovati M, Anfossi G. Influence of insulin and of insulin resistance on platelet and vascular smooth muscle cell function [J]. J Diabetes Complications, 2002, 16(1): 35.

[6] 彭哲, 王硕仁, 李秋梅, 等. 解毒活血益气方药物血清对兔血管平滑肌细胞增殖及脂质过氧化的影响[J]. 中国医药学报, 2004, 19(6): 341.

[7] Weissberg P L, Bennett M R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340

(24): 1928.

[8] 闫凤, 陈压西, 赵长海. 慢性炎症与动脉粥样硬化关系的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(20): 3964.

[9] 李伟东, 王光宁, 蔡宝昌. HPLC 法测定四妙勇安汤有效部位中绿原酸阿魏酸的含量 [J]. 中华中医药学刊, 2006, 24(12): 2228.

[10] 辛华, 丰杰, 程若敏, 等. HPLC 测定不同产地金银花中绿原酸和木犀草苷 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 11(2): 60.

[11] 陈卓, 宋娟, 周熙艳, 等. 四妙勇安汤抗炎有效部位中总黄酮的含量测定 [J]. 南京中医药大学学报, 2007, 23(6): 385.

[12] 林丽, 晋玲, 李应东, 等. 当归干、鲜品中游离阿魏酸和总阿魏酸含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 94.

[13] 华静, 戚进, 余伯. 玄参属植物中的环烯醚萜类化学成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 233.

[14] 谢文光, 邵宁生, 马晓昌, 等. 玄参治疗大鼠内毒素血症的血清蛋白质组变化的初步研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 877.

[15] Ju Y, Hua J, Sakamoto K, et al. Glucosamine, a naturally occurring amino monosaccharide modulates LL-37-induced endothelial cell activation [J]. Int J Mol Med, 2008, 22(5): 657.

[16] 张军平, 袁卓, 李明, 等. 四妙勇安汤稳定动脉粥样硬化斑块拮抗炎症反应的分子生物学机制研究 [J]. 天津中医药, 2009, 26(5): 366.

[17] Hafid Ait-Oufella, Soraya Taleb, Ziad Mallat, et al. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31: 969.

[18] Zhang H, Park Y, Wu J, et al. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction [J]. Clin Sci, 2009, 116(3): 219.

[19] Robert Kleemann, Susanne Zadelaar, Teake Kooistra. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice [J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(3): 360.

[20] Tsuchiya K, Nakayama C, Iwashima F, et al. Advanced endothelial dysfunction in diabetic patients with multiple risk factors; importance of insulin resistance [J]. J Atheroscler Thromb, 2007, 14(6): 303.

[责任编辑 聂淑琴]