

冠通方及其拆方含药血清 对大鼠血管平滑肌细胞凋亡的影响

彭红华¹, 苏毅强¹, 李晓红¹, 秦祖杰¹, 吴光¹, 韦玉兰¹, 邓家刚¹,
刘濮滑², 李丹³, 蒋慧华¹, 罗眈¹, 何劲松¹, 王强¹, 杨力强^{1*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 广西上思县人民医院, 广西上思 535500;
3. 湖南省长沙市第二社会福利院, 长沙 410000)

[摘要] **目的:**通过冠通方及其拆方含药血清对血管紧张素 II 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖及凋亡的影响研究,探讨冠通方防治再狭窄的部分作用机制。**方法:**每组 SD 大鼠每天给药剂量分别为冠通方组 23.75 g·kg⁻¹,活血祛瘀组 8.75 g·kg⁻¹,益气养阴组 5 g·kg⁻¹,清热化痰组 10 g·kg⁻¹,连续给药 7 d,制备冠通方及其各拆方含药血清,将大鼠 VSMC 分为 6 组(每组 6 个复孔),空白组加 5% 正常大鼠血清,模型组加 5% 正常大鼠血清及 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的 Ang II,冠通方及各拆方组在每组分别加入 5% 含药血清及 10⁻⁶ mol·L⁻¹ 的 Ang II,孵育 48 h 后,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率;**结果:**血管平滑肌细胞模型组早期细胞凋亡率(0.36 ± 0.14)%,晚期细胞凋亡率(1.02 ± 0.86)% 与空白对照组早期细胞凋亡率(2.22 ± 0.43)%,晚期细胞凋亡率(1.29 ± 0.57)% 相比,细胞凋亡率均明显降低(P < 0.01)。与模型组相比早期、晚期细胞凋亡率冠通方组为(23.4 ± 0.95)%, (9.1 ± 0.69)%、活血祛瘀组为(8.08 ± 0.54)%, (18.6 ± 1.48)%、益气养阴组(16.9 ± 0.79)%, (4.38 ± 0.90)%、清热化痰组(5.9 ± 0.99)%, (11.5 ± 0.71)%,早期及晚期凋亡率均明显升高(P < 0.05);**结论:**冠通方抑制 VSMC 的增殖与影响其周期、诱导其凋亡有关;且冠通方组作用优于其拆方组。

[关键词] 冠通方; 含药血清; 血管平滑肌细胞; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0229-04

[doi] 10.11653/syjf2013100229

Influence of Guantong Fang and Its Disassembled Prescription Medicated Serum on Apoptosis of Rat Vascular Smooth Muscle Cells

PENG Hong-hua¹, SU Yi-qiang¹, LI Xiao-hong¹, QIN Zu-jie¹, WU Guang¹, WEI Yu-lan¹, DENG Jia-gang¹,
LIU Pu-hua², LI Dan³, JIANG Hui-hua¹, LUO Dan¹, HE Jin-song¹, WANG Qiang¹, YANG Li-qiang^{1*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China;

2. Guangxi Shangsi County People's Hospital, Shangsi 535500, China;

The Second Social Welfare Home in Changsha City, Hunan Province, Changsha 410000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of serum containing Guantong Fang and its compositions on apoptosis in rat vascular smooth muscle cells. **Method:** SD rats in each group were administered corresponding doses: Guantong Fang group (23.75 g·kg⁻¹), Huoxue Huayu (HXHY) group (8.75 g·kg⁻¹), Yiqi Yangyin (YQYY) group (5 g·kg⁻¹), Qingre Huatan (QRHT) group (10 g·kg⁻¹) for 7 days. Then the serum containing drugs was prepared, VSMCs were divided into: blank control group (5% normal rat serum), model group (5% normal rat serum and 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ Ang II), Guantong Fang group (5% Guantong Fang Containing serum and 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ Ang II), HXHY group (5% HXHY Containing serum and 1 × 10⁻⁶ mol·L⁻¹ Ang II), YQYY

[收稿日期] 20120916(003)

[基金项目] 广西科技攻关项目(桂科攻 0816004-35)

[第一作者] 彭红华, 副教授, 从事方剂配伍研究, Tel: 0771-2148288; E-mail: phhpenghonghua@sohu.com

[通讯作者] * 杨力强, 教授, 博士, 从事方剂配伍及作用机制研究, Tel: 13878179926, E-mail: ylq6606@163.com

group (5% YQYY Containing serum and $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ang II}$), QRHT group (5% QRHT Containing serum and $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Ang II}$), After incubated 48h, cell apoptosis was evaluated by laser flow cytometry. **Result:** in the model group the early apoptosis rate of vascular smooth muscle cell was $(0.36 \pm 0.14)\%$, late apoptosis $(1.02 \pm 0.86)\%$, and in blank control group: early apoptosis $(2.22 \pm 0.43)\%$, late apoptosis $(1.29 \pm 0.57)\%$; In the Guantong Fang group: early $(23.4 \pm 0.95)\%$, late $(9.1 \pm 0.69)\%$, in HXHY group: early $(8.08 \pm 0.54)\%$, late $(18.6 \pm 1.48)\%$, in YQYY group early $(16.9 \pm 0.79)\%$, late $(4.38 \pm 0.90)\%$, in QRHT group early $(5.9 \pm 0.99)\%$, late $(11.5 \pm 0.7)\%$. **Conclusion:** Guantong Fang can inhibit the proliferation of VSMC and induce apoptosis; and effect of Guantong Fang group is better than its compositions.

[Key words] Guantong Fang; medicated serum; vascular smooth muscle cells; apoptosis

1 材料

1.1 动物 大鼠血管平滑肌细胞(Rat vascular smooth muscle cells,简称 VSMC)从湖南长沙赛晶技术有限公司提供。SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 $(250 \pm 10) \text{ g}$,由广西医科大学实验动物中心提供,动物许可证号 2003-001x。

1.2 试剂 碘化丙啶(PI,美国 Sigma 公司),RNA 酶 A(RNase A,美国 Sigma 公司),Annexin V-PE 细胞凋亡试剂盒(美国 BD 公司 PharMingen 系列产品),胰蛋白酶(Trypsin,天津市景洋生物制品有限责任公司产品)。

1.3 仪器 CK40 型倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS 公司),BR4I 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo Forma 公司),Sunrise 型酶标仪(奥地利 Biocell 公司),500-BS-11 型电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),Epics XL 型流式细胞仪分析系统,美国 Beckman 公司。

1.4 冠通方及其拆方水煎液制备 冠通方全方组、活血祛瘀组、益气养阴组、清热化痰组药物均由广西中医学院仁爱分院提供,广西中医学院中药制剂教研室煎煮。①将各组药物浸泡 30 min 后(水浸过药面 2cm)。②武火煮沸后改用文火煎 30 min,冷却 30 min 后滤渣取汁。将滤渣如上法再煎煮 2 次取汁。③将 3 次药汁混合,用文火浓缩至 300 mL,所制得各组药物水煎剂,含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,置冰箱 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用,使用前按要求配成所需浓度。

2 方法

2.1 大鼠分组 将 60 只成年大鼠,每组雌雄各半随机分为 6 组,即空白组、模型组、冠通方组(田七、丹参、地龙、瓜蒌、生晒参、绞股蓝、陈皮、麦冬),活血祛瘀组(田七、丹参、地龙),益气养阴组(生晒参、麦冬)、清热化痰组(绞股蓝、瓜蒌、陈皮),每组 10 只。

2.2 给药剂量及方法 根据王宁生^[1]等实验研究

结果,给药剂量以整体模型动物的有效剂量为临床成人的 8~18 倍为宜,本实验大鼠的灌胃药量取成人(60 kg)剂量的 15 倍。大鼠用药量冠通方全方组为 $23.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;活血祛瘀组 $8.75 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;益气养阴组 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$;清热化痰组 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,按照 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$ 。

2.3 取血及血清的处理方法 按文献[2]制备含药血清,每天给药 2 次,连续 ig 7 d,最后 1 次性 ig 1 d 量 1 h 后(给药前 12 h 禁食不禁水),用乙醚麻醉腹主动脉取血,常温静置 4 h, $3500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 10 min,分离血清,然后将同组大鼠的血清混合, $56 \text{ }^\circ\text{C}$, 30 min 灭活处理,用 $0.22 \text{ } \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,分装, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.4 VSMC 的传代与培养及冻存 将 VSMC 细胞株置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 CO_2 培养箱中培养,待其贴壁状况良好,长势良好的时候(细胞长至培养瓶底 80%~90%,对数生长期最佳),使用 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)将细胞消化下来,离心后弃原培养液上清,再加入新鲜 5% 胎牛血清 DMEM 培养液重悬,血小球计数板计数,以密度 $1 \times 10^6 / \text{mL}$ 接种于新的培养瓶,于培养箱中培养。将 VSMC 细胞株接种于培养瓶中培养,每瓶加入 5 mL 5% 胎牛血清 DMEM 培养液培养,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 的 CO_2 培养箱中培养,隔天换液。选对数生长期的细胞,常规处理后加入冻存液,转入冻存管中密封。最后移入 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.5 分组及处理 参照文献[3]选择生长良好的 4 代-6 代 VSMC 胰蛋白酶消化制备细胞悬液,调整细胞密度为 $5.0 \times 10^7 / \text{L}$,接种于培养板,经 24 h 预培养,12 h 低体积分数(1%)血清培养液预处理后,随机分为 6 组(每组 6 个复孔),各组按要求加入相应工作液移入培养箱中培养 48 h,空白组:5% 正常大鼠血清;模型组:5% 正常大鼠血清及 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ang II;冠通方及各拆方组在每组分别加入

5%含药血清及 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Ang II。

2.6 测定方法 具体操作步骤按照 AnnexinV-PE/7-AAD 试剂盒说明书来进行:以 0.25% 胰蛋白酶将细胞从培养瓶底消化吹打下来,收集入离心管中。细胞计数后 ($1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞悬液) 进行离心 ($2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min), PBS 洗细胞 2 次,混匀。最终细胞悬液细胞数为 $1 \times 10^6/\text{mL}$;转移 100 μL 的细胞悬液到另一支 5 mL 的离心管里;加入 5 μL 的 AnnexinV-PE 试剂。轻轻摇晃后室温避光;再加入 5 μL 的 7-AAD 试剂。轻轻摇晃后室温避光;轻柔涡旋细胞悬液,常温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 避光孵育 15 min;加入 400 μL $1 \times \text{binding buffer}$ 至每管中,于 1 h 内上机检测。连测 3 次;在 Epics XL 流式细胞仪分析系统上进行测定,氩离子激光器 488 nm 波长光激发;阻断滤片为 535 的长波通滤片。系统自动计算出细胞各期的凋亡情况。注意整个动作要尽量轻柔,切勿用

力吹打细胞。若造成细胞损伤可明显影响实验的结果。

2.7 统计学处理 采用统计学软件包 SPSS 11.0 进行分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多样本均数间两两比较采用 q 检验,率的检验采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

实验结果见表 1,与空白组相比,模型组的早期及晚期凋亡率均降低,统计学分析有意义 ($P < 0.01$),提示 Ang II 具有抑制 VSMC 凋亡的作用。与模型组相比,各药物组作用 48 h 后,药物各组 VSMC 的早期及晚期凋亡率的百分比均明显升高,统计学分析有意义 ($P < 0.05$),提示冠通方及拆方具有诱导 VSMC 凋亡作用。各药物组间相比,细胞总体凋亡率以全方组作用最强,各拆方组间以活血祛瘀组效果较明显 ($P < 0.05$)。

表 1 冠通方及其拆方含药血清对 VSMC 的凋亡各阶段的比率的影晌 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | 活细胞 | 早期凋亡 | 晚期凋亡 | 死细胞 |
|------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| 空白 | - | 93.4 \pm 0.98 | 2.22 \pm 0.43 | 1.29 \pm 0.57 | 2.02 \pm 0.74 |
| 模型 | - | 96.4 \pm 0.88 ¹⁾ | 0.36 \pm 0.14 ¹⁾ | 1.02 \pm 0.86 | 2.27 \pm 1.08 |
| 冠通方 | 23.75 | 68.1 \pm 1.13 ²⁾ | 23.4 \pm 0.95 ²⁾ | 9.1 \pm 0.69 ²⁾ | 0.31 \pm 0.28 ²⁾ |
| 活血祛瘀 | 8.75 | 72.4 \pm 0.77 ^{2,3)} | 8.08 \pm 0.54 ^{2,3)} | 18.6 \pm 1.48 ^{2,3)} | 0.89 \pm 0.42 ^{2,3)} |
| 益气养阴 | 5 | 77.5 \pm 1.04 ^{2,3,4)} | 16.9 \pm 0.79 ^{2,3,4)} | 4.38 \pm 0.90 ^{2,3,4)} | 1.24 \pm 0.49 ³⁾ |
| 清热化痰 | 10 | 83.4 \pm 1.31 ^{2,3,4,5)} | 5.9 \pm 0.99 ^{3,4,5)} | 11.5 \pm 0.71 ^{3,4,5)} | 0.91 \pm 0.38 ^{2,3)} |

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与冠通方组比较³⁾ $P < 0.05$;与活血祛瘀组比较⁴⁾ $P < 0.05$;与益气养阴组比较⁵⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

冠通方是基于冠心病冠状动脉支架植入术后再狭窄 (ISR) “正气虚于内,痰热瘀血痹于中”之病机认识,采用益气养阴,清热化痰,行气活血化痰通络原则立法遣药组方的。课题组前期研究表明,冠通方可减少冠状动脉裸金属支架植入术后再狭窄的发生率^[4];其含药血清具有抑制大鼠血管平滑肌细胞 (VSMC) 的增殖作用^[5]。在 ISR 形成过程中,中膜 VSMC 增殖和凋亡是 ISR 主要病理基础之一。因此本研究以 VSMC 为靶细胞,选择在 ISR 形成中发挥重要介导作用的 Ang II 作为诱导因素,应用血清药理学的方法,观察冠通方及其拆方含药血清对 Ang II 诱导的 VSMC 增殖及凋亡相关因素的影响。

细胞凋亡是一种以凋亡小体的形成为特点的,不引起周围组织的炎性反应的活体内单个细胞死亡的形态学改变。VSMC 增殖和凋亡受阻是许多心血管疾病如动脉粥样硬化、高血压病、再狭窄等的重要发病机制^[6]。文献报道^[7-9]中药复方抑制 VSMC 增

殖有很好的疗效。

ISR 形成时,VSMC 的增殖是主要原因,但凋亡的相对不足也是一个重要因素。细胞凋亡是有核细胞通过启动自身内部遗传机制激活内源性 DNA 内切酶而发生的一种细胞程序性死亡过程。如 VSMC 的增殖率远远大于细胞凋亡率,这就使得细胞凋亡相对不足导致 VSMC 大量聚集。因此,诱导 VSMC 凋亡成了防止 ISR 发生的一个重要环节。

本实验结果显示,冠通方及其拆方作用 48h 后,VSMC 的早期及晚期凋亡百分比明显升高,但以全方组效果最好,活血祛瘀拆方组次之。提示冠通方抑制 VSMC 增殖可能与诱导其发生凋亡有关。

[参考文献]

- [1] 王宁生,雷燕,刘平,等.关于血清药理学的若干思考[J].中国中西医结合杂志,1999,19(5):263.
- [2] 刘晓梅.薏苡仁的药理研究与临床新用[J].中国医药指南,2010,8(2):36.

姬松茸多糖对大鼠胸腺细胞凋亡和线粒体膜电位的影响

黄清松^{1*}, 李红枝¹, 陈爱葵²

(1. 广东药学院基础学院, 广州 510006; 2. 广东第二师范学院生物系, 广州 510303)

[摘要] 目的: 观察姬松茸多糖对地塞米松(dexamethasone, DEX)诱发大鼠胸腺细胞凋亡和线粒体膜电位的影响。方法: Wistar 大鼠随机分为 4 组: 正常组, 模型组, 姬松茸多糖低、高剂量组, 每组 10 只。正常组和模型组灌胃(ig)生理盐水, 姬松茸多糖低、高剂量组 ig 姬松茸多糖溶液(60, 120 mg·kg⁻¹), 1 次/d, 连续 7 d。模型组和姬松茸多糖低、高剂量于第 7 日腹腔注射 DEX(0.02 g·kg⁻¹)。3 h 后处死各组动物, 迅速无菌取胸腺, 采用显微观察、流式细胞技术观察胸腺细胞形态学改变, 胸腺细胞凋亡、脱氧核糖核酸(DNA)断裂百分率及线粒体膜电位变化, 胸腺组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的变化。结果: 与模型组比较, 姬松茸多糖组大鼠胸腺细胞线粒体肿胀明显减轻; 姬松茸多糖组大鼠胸腺细胞凋亡率[低、高剂量(5.96 ± 1.14)%, (5.07 ± 1.02)%], DNA 断裂率[低、高剂量(3.67 ± 0.49)%, (3.24 ± 0.45)%]及胸腺组织 MDA 含量[低、高剂量(1.87 ± 0.25), (1.72 ± 0.23) μg·mg⁻¹]均明显低于模型组[(7.14 ± 1.62)%, (4.25 ± 0.86)%, (2.16 ± 0.38) μg·mg⁻¹]; 姬松茸多糖组大鼠胸腺细胞线粒体膜电位(荧光指数: 低剂量 38.57 ± 6.29, 高剂量 41.36 ± 7.18)及胸腺组织 SOD 活性量[低、高剂量(25.78 ± 3.94), (27.36 ± 4.21) U·mg⁻¹]明显高于模型组(32.76 ± 5.48) 荧光指数, (21.45 ± 3.52) μg·mg⁻¹。结论: 姬松茸多糖可阻断胸腺细胞 DNA 断裂和线粒体膜电位的下降, 有效抑制 DEX 诱导的胸腺细胞凋亡, 其作用机制与姬松茸多糖提高胸腺组织抗氧化功能有关。

[关键词] 姬松茸多糖; 胸腺细胞; 凋亡; 线粒体膜电位

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)10-0232-04

[doi] 10.11653/syfy2013100232

Effect of *Agaricus blazei* Polysaccharide on Thymocyte Apoptosis and Mitochondrial Membrane Potential in Rats

HUANG Qing-song^{1*}, LI Hong-zhi¹, CHEN Ai-kui²

(1. School of Basic Courses of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China;

2. Biology Department of Guangdong University of Education, Guangzhou 510303, China)

[收稿日期] 20121124(005)

[通讯作者] * 黄清松, 硕士, 高级实验师, 从事细胞生物学研究, Tel: 13416349399, E-mail: p84188896@163.com

- [3] 李新荣, 李艳平. 丹参酮 II_A 对大鼠血管平滑肌细胞的增殖作用[J]. 中国临床康复, 2006, 10(31): 55.
- [4] 何劲松, 王强, 易自刚, 等. 冠通方对冠状动脉裸金属支架植入术后再狭窄的影响[J]. 中医杂志, 2010, 51(5): 423.
- [5] 李丹, 何宜荣, 刘濮华, 等. 冠通方及其拆方含药血清对 Ang II 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2010, 12(9): 59.
- [6] Baxter G D, Lavin M F. Specific protein dephosphorylation in apoptosis induced by ionizing radiation and heat shock in human lymphoid tumor lines[J]. J Immunol, 1992, 148(6): 1949.
- [7] 王平, 程静, 田代志, 等. 固本化痰通脉方含药血清对大鼠血管平滑肌细胞增殖及细胞周期素 D₁ 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(9): 22.
- [8] 曹文疆, 邢建国, 王新春, 等. 香青兰总黄酮对 TNF-α 诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 159.
- [9] 袁禄根, 刘玉晖, 游宇, 等. 补阳还五汤抑制同型胱氨酸介导的血管平滑肌细胞增殖[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(2): 166.

[责任编辑 聂淑琴]