

桑仙降压颗粒对 SHR 大鼠 心肌微血管密度的干预研究

张蕴慧*

(山东省中医院心内科, 济南 250014)

[摘要] 目的:观察自拟补肾活血方桑仙降压颗粒剂对自发性高血压大鼠(SHR)心肌微血管密度(MVD)的干预,探讨其对微血管数目变化的影响。**方法:**SHR 随机分为 3 组,模型对照组、吡达帕胺($0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)西药对照组、桑仙降压颗粒(含生药 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组,以 Wistar 大鼠为正常对照(蒸馏水),每组 6 只,每周用药 6 d,1 次/d,4 周及 8 周后观察 SHR 心肌 MVD 的表达。**结果:**与模型组比较,4 周及 8 周后桑仙降压颗粒组标记心肌 MVD 的 CD34 表达均明显增多。**结论:**桑仙降压颗粒能有效减轻 SHR 大鼠心肌微血管损害。

[关键词] 桑仙降压颗粒;自发性高血压大鼠;心肌微血管密度;CD34

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0266-02

传统的高血压中医治法总是从肝阳上亢、肝肾阴虚、痰湿中阻立论。高血压迁延难愈,从病程来看,符合“久病及肾”的理论,高血压在整个病程中,尤其伴随心脑血管靶器官损害时,常常出现瘀血表现^[1],近年来,肾虚血瘀证作为高血压病发生机制之一,逐渐被人们所重视,作者以补肾活血为治法组桑仙降压方,具有良好的降压效果^[2]。本研究通过对自发性高血压大鼠(SHR)心肌 CD34 的观测,探讨桑仙降压颗粒对微血管密度的作用。

1 材料

1.1 动物 4 周龄 SHR,雌雄各半,体重 200 ~ 240 g,由中国医科院阜外心血管医院提供(医动字第 01-108 号)。4 周龄 Wistar 大鼠,雌雄各半,体重 210 ~ 250 g,由山东医科大学动物室提供,动物合格证号 SCXK(鲁)20090001。

1.2 药物 桑仙降压颗粒由桑寄生、淫羊藿、丹参、川芎等组成,由山东中医药大学中药制剂室按正交试验法优选工艺制成,含生药 $6 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$,临用前加蒸馏水稀释成含生药 $0.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。吡达帕胺片,天津力生制药股份有限公司提供,制成 $0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 混悬液,4 ℃ 冰箱保存备用,使用前摇匀。

1.3 试剂 CD34 抗体、生物素化山羊抗兔 IgG,链

霉亲和素 2 生物素(SABC)和 DAB 显色剂,均由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.4 仪器 METTLER AE20 型电子分析天平,海特勒托利多(上海)仪器有限公司提供;光学显微镜,由山东省中医院病理科提供。

2 方法

2.1 分组给药 SHR 均分为 3 组:模型组(蒸馏水 ig),吡达帕胺组($0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),桑仙降压颗粒组(含生药 $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig)。另设空白对照组(Wistar 大鼠,蒸馏水 ig),均每周给药 6 d。4,8 周后取材。

2.2 取材 末次用药后 24 h,禁食不禁水 12 h,用戊巴比妥钠($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}$) ip 麻醉后立即经腹主动脉注入 4 ℃ 生理盐水,切开下腔静脉放血,待冲洗液干净无色后,立即开胸,快速分离、摘取心脏,置入 4 ℃ 生理盐水中快速冲洗 3 次备测。

2.3 心肌微血管密度(MVD)检测 采用免疫组化 SP 法。心脏组织切片经脱蜡,梯度乙醇脱水后,抗原高压热修复。以 3% 双氧水孵育 10 min,5% 正常的羊血清室温孵育 15 min,倾去,勿洗。滴加适当比例稀释的一抗,4 ℃ 冰箱过夜, PBS 冲洗,每次 3 min,共 3 次。滴加二抗,室温孵育 15 min, PBS 冲洗,每次 3 min,共 3 次。滴加三抗,室温孵育 15 min, PBS 冲洗,每次 3 min,共 3 次。DAB 染色,苏木素复染,常规脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。结果判断:参照 AXIOTIS 等^[3]的标准,由两位病理医生采用盲法(独立检测)读片。每张切片高倍镜下($\times 400$ 倍)随机选取 10 个不重复的视野(不足 10 个视野的,按实际观察到的视野计数),共观察 1 000

[收稿日期] 20120213(166)

[基金项目] 山东省中青年科学家基金(2006BS03047);山东省自然科学基金(30873241)

[通讯作者] *张蕴慧,博士,副主任医师,从事临床工作, Tel: 0531-68617958, E-mail: johnyh1011 @ yahoo.com.cn

个细胞,综合染色强度和阳性细胞数量进行判定。

①按切片中细胞着色深浅评分:0分为细胞无显色;1分为黄色;2分为棕黄色;3分为棕褐色。②按阳性细胞数占同类细胞数的%评分:1分为<25%;2分为25%~50%;3分为50%~75%;4分为>75%。取①、②两项评分的乘积作为总积分:0~3分为(-);>3分且≤6分为(+);>6分且≤9分为(++);>9分为(+++)。(-/+)为低表达,(++/+++)为高表达。

2.4 统计学方法 计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较用单因素分差分析。采用 SPSS 17.0 软件进行, $P < 0.05$ 为差别显著。

3 结果

各组大鼠心肌 CD34 表达 实验前,模型组大鼠 CD34 表达积分为 (7.28 ± 0.47) 分,明显低于正常对照组 ($P < 0.05$)。给药 4 周,模型组 CD34 积分,明显低于正常对照组 ($P < 0.05$)。两给药组与模型比较无统计学意义。给药 8 周,模型组 CD34 下降更明显,与正常对照组相比 ($P < 0.01$),而桑仙降压颗粒组与吡啶帕胺组 CD34 表达均明显增多 ($P < 0.01$),两给药组间比较无统计学差异。见表 1,图 1。

表 1 桑仙降压颗粒对大鼠心肌 CD34 表达积分比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

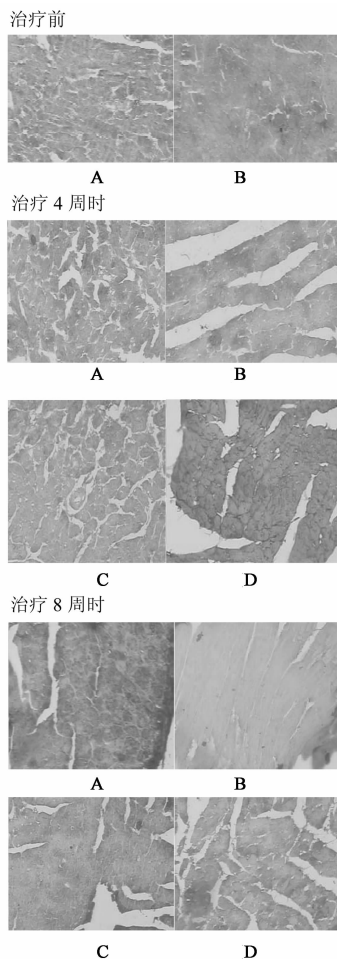
组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	给药前	给药后	
			4 周	8 周
正常对照	-	$9.56 \pm 0.68^{1)}$	$9.43 \pm 0.71^{1)}$	$9.49 \pm 0.54^{2)}$
模型对照	-	7.28 ± 0.47	7.08 ± 0.31	3.32 ± 0.64
吡啶帕胺	2.5×10^{-4}		7.20 ± 0.35	$6.67 \pm 0.49^{2)}$
桑仙降压颗粒	8		7.15 ± 0.40	$6.43 \pm 0.77^{2)}$

注:与同时点模型组比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

既往研究常将瘀血与血液的高凝状态,大、中动脉弹性相联系,鲜有与微血管密度相关的报道,然微血管密度的改变必影响血液的正常循行,从而导致瘀血证的发生。微血管的损害常表现为数目的减少,本实验本着选择良好的血管内皮标记物计数微血管,判定血管生成状况,在血管内皮标记物如 VIII 因子相关抗原、CD31、CD34 抗原中,以 CD34 抗原特异性最高^[4],故选择 CD34 作为血管内皮标记物,利用其抗体进行免疫组化染色可测量缺血组织微血管密度。

本研究结果显示,实验前,模型组大鼠心肌 CD34 表达明显低于正常对照组;给药 8 周后,心肌 CD34 表达减少更明显,可见随着周龄增加微血管减少也随之加重。与模型组比较,两给药组 CD34 表达均明显增多。因此我们推论桑仙降压颗粒能有



A. 正常对照组;B. 模型组;C. 桑仙降压颗粒 $8 g \cdot kg^{-1}$ 组; D. 吡啶帕胺 $2.5 \times 10^{-4} g \cdot kg^{-1}$ 组

图 1 各组大鼠心肌 CD34 的表达 (免疫组化, $\times 400$)

效减轻高血压出现的微血管损害,且随着用药时间延长,其对微血管的保护作用越好,与吡啶帕胺作用强度相似,且其副作用较西药小,从而为进一步临床应用提供了科学依据。

[参考文献]

- [1] 王宏宇,李志明,张维忠,等. 人类高血压与内皮功能[J]. 心血管病学进展,2000,31(1):36.
- [2] 张蕴慧. 桑仙降压颗粒对高血压病人血压和内皮功能的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2004,2(9):497.
- [3] Abraham J A, Mergia A, Whang L, et al. Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor [J]. Science, 1986,233:545.
- [4] 宋京郁,狄纯婵,李慧,等. CD34 在人冠状动脉粥样硬化病变中的表达[J]. 中国动脉硬化杂志,2010,18(9):705.

[责任编辑 何伟]