

当归芍药散对血脂异常大鼠抗氧化能力及动脉壁血管细胞黏附分子-1基因表达的影响

阎艳丽^{1*}, 吉梅², 宋晓宇³, 李清¹, 徐薇⁴, 杨旭杰¹

(1. 河北医科大学中医学院, 河北石家庄 050091; 2. 河北北方学院, 河北张家口 075000;
3. 河北医科大学中医学院门诊部, 河北石家庄 050091; 4. 北京市和平里医院, 北京 100013)

[摘要] 目的: 观察当归芍药散(DSS)对血脂异常大鼠抗氧化能力及动脉壁血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)mRNA表达的影响。方法: 采用高脂饲料喂养法复制血脂异常大鼠模型, 同时给予治疗药物DSS(汤剂)高、低剂量及阳性对照药血脂康, 连续8周, 检测各组大鼠血清胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)及氧化型低密度脂蛋白胆固醇(ox-LDL)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平, 并用反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定大鼠主动脉VCAM-1mRNA的表达。结果: 与模型组相比, DSS高、低剂量组和血脂康组均能明显降低大鼠血清TC、TG、LDL-C及ox-LDL、MDA水平($P < 0.01$), 均能明显升高HDL-C、SOD水平($P < 0.01$)。RT-PCR法显示DSS高、低剂量组和血脂康组均能显著降低大鼠主动脉组织中VCAM-1mRNA的表达($P < 0.01$), 其中DSS高剂量组降低趋势优于低剂量组和血脂康组。结论: DSS高、低剂量组均可较好地调节血脂异常大鼠脂质代谢, 清除自由基、抗脂质过氧化损伤并下调动脉壁VCAM-1基因的表达, 提示其具有保护血管内皮细胞功能的作用, 可进一步抑制动脉粥样硬化的发生发展。

[关键词] 当归芍药散; 血脂异常; 脂质过氧化; 血管细胞黏附分子-1mRNA; 血管内皮细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2007)02-0025-04

The Experimental Study of Danggui Shaoyao San's Protective Influence on the Dyslipidemia Rats' Vascular Function of Endothelin Cells

YAN Yan-li^{1*}, JI Mei², SONG Xiao-yu³, LI Qing¹, XU Wei⁴, YANG Xu-jie¹

(1. Hebei Medical University of Traditional Chinese Medicinal College, Shi Jiazhuang 050091, China;
2. Hebei North University, Zhang Jiakou 075000, China; 3. The Clinic of Hebei Medical University
of Traditional Chinese Medicinal College, Shi Jiazhuang 050091, China;
4. The Hepingli Hospital of Beijing, Beijing 100013, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Danggui Shaoyao San (DSS) on lipid's peroxidation and the expression of VCAM-1mRNA in dyslipidemia rats. **Methods:** Hyperlipemia of rat model was duplicated by feeding high lipid fodder, at the same time, the rats were treated with DSS and positive control medicine. Eight weeks later, blood lipids level as well as the content of ox-LDL, MDA and SOD were detected by RIA kit. The expression of the VCAM-1mRNA was detected by RT-PCR. **Results:** The TC, TG, LDL-C, ox-LDL and MDA in DSS group and the positive control group were decreased while the HDL-C and SOD were increased, compared with the model group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). The result of RT-PCR showed that DSS and positive control group could inhibit the VCAM-1mRNA' expression in

[收稿日期] 2006-07-26

[基金项目] 河北省科技厅攻关计划项目(03276196D-4)

[通讯作者] * 阎艳丽, Tel: (0311) 86265251; E-mail: xiaoyusong@tom.com

the rat aorta. **Conclusion:** DSS can inhibit lipid's peroxidation damage and decrease the expression of VCAM-1mRNA in rats. The results indicated that DSS could protect the VEC's function.

[**Key words**] Danggui Shaoyao San; Dyslipidemia; Lipid's peroxidation; VCAM-1mRNA; Vascular Endothelin Cells

当归芍药散(DSS)出自《金匱要略》,原为妇科良方,近年来根据中医学“谨守病机,异病同治”的原则,其应用范围不断拓展,已施治于多种病症。本课题组前期研究发现其具有较好的调节高脂血症家兔血脂代谢,抑制脂质在肝脏沉积的作用,并可改善血流变学指标,降低血液黏度与红细胞的聚集性^[1]。本实验进一步观察了DSS对脂质代谢、机体抗氧化能力及单核细胞黏附的影响,旨在探讨DSS保护血管内皮细胞(VEC)功能进而抗AS发生发展的作用及其可能机制,现报道如下:

1 材料

1.1 动物 健康雄性Wistar大鼠50只,体重180~200g,由河北医科大学实验动物中心提供。合格证号:DK0502-0055。

1.2 药物 当归芍药散(当归:芍药:川芎:茯苓:白术:泽泻为3:16:8:4:4:8,其中芍药为赤芍、白芍各半)组成的药物购自河北省医药药材公司,经本院中药系鉴定,符合国家药典标准。结合现代临床常用量,取当归为10g,按比例计算其他五味药的剂量,确定全方成人(按60kg计)每日用药量:根据“人体-大鼠体表面积比值法”换算大鼠的用药量,最终确定为低剂量:14g生药/(kg·d);高剂量:28g生药/(kg·d)。取上述诸药,浸泡30min后,水提3次,将3次水提液混合浓缩至2.8g生药/mL,0~4℃冰箱保存备用。使用时,高剂量按此浓度,低剂量用蒸馏水稀释一倍。血脂康为北京北大维信生物科技有限公司生产,批号20050220,临用前将胶囊内容物研细,加蒸馏水制成0.012g/mL的混悬液。

1.3 试剂 胆固醇(批号050321)、胆酸钠(批号050328),两者均为北京化学试剂公司生产;丙基硫氧嘧啶(批号050203),上海复星朝晖药业有限公司生产;新鲜猪油,石家庄市肉联厂提供;胆固醇(TC)试剂盒(批号050625)、甘油三酯(TG)试剂盒(批号050628)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)试剂盒(批号050622)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒(批号050620)均由中生北控生物科技股份有限公司提供;氧化型低密度脂蛋白胆固醇(ox-LDL)试剂盒(批号

050618)由上海荣盛生物试剂厂提供;丙二醛(MDA)试剂盒批号(050624)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号050620)均由南京建成生物工程研究所提供。反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)主要试剂:RNA提取试剂(Trizol Reagent)由美国Invitrogen公司提供;M-MLV反转录酶、核糖核酸酶抑制剂(RNasin)、DNTP、溴酚兰、焦碳酸乙二酯(DEPC)、随机引物(Random primers)均由美国Promega公司提供;Taq DNA聚合酶(Taq DNA polymerase)、琼脂糖(agarose)均由华美生物工程公司提供;PCR反应体系由北京赛百盛生物工程公司提供;氯仿、异丙醇由北京化学试剂公司提供。

1.4 仪器 TDL-5-A型离心机,上海安亭科学仪器厂生产;ZS-3型半自动生化分析仪,北京中生生物工程高科技公司生产;RT-PCR所用仪器756型紫外分光光度计,上海光谱仪器有限公司生产;GeneAmp 5700型PCR仪,美国PE公司生产;RS-28高速低温离心机,超低温冰箱,德国贺利氏公司生产;UVP凝胶扫描系统,美国UVP公司生产;微量移液器,德国Gilson公司生产;DYZ-22A型双恒定时电泳仪,北京市六一仪器厂生产。

2 方法

2.1 动物模型的建立与分组 将50只大鼠随机分为5组,每组10只,分别为正常对照组、模型组、DSS高剂量组(28g生药·kg⁻¹·d⁻¹)、DSS低剂量组(14g生药·kg⁻¹·d⁻¹)和阳性药血脂康组(0.12g·kg⁻¹·d⁻¹)。除正常对照组外,其余各组均喂饲高脂饲料(饲料配方:胆固醇2%,胆酸钠0.2%,丙基硫氧嘧啶0.2%,猪油10%,基础饲料87.6%)。每日下午3时DSS高剂量组、DSS低剂量组和血脂康组按组别灌服药物,正常对照组和模型组灌服等体积蒸馏水。连续8周。

2.2 各项生化指标测定 末次给药后,禁食12h,断头取血,分别测定血清TC(CHOD-PAP法)、TG(GPO-PAP法)、HDL-C(磷钨酸-镁沉淀法)、LDL-C(聚乙烯硫酸沉淀法)、ox-LDL(酶联免疫吸附双抗体夹心法)、MDA(硫代巴比妥酸法)及SOD(黄嘌呤氧化

酶法) 水平。

2.3 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR) 半定量测定主动脉组织中 VCAM-1mRNA 的表达。

2.3.1 组织总 RNA 的提取 处死大鼠后, 迅速取出胸主动脉和升主动脉约 100 mg, 洗去血液后, 置于液氮中保存。每次提取时在冰浴匀浆器中加入 1 mL Trizol 及 100 mg 组织, 迅速研磨, 将匀浆液移入 EP 管中, 加入 200 μ L 氯仿, 剧烈震荡 30 s, 冰上放置 5~ 10 min, 取上层水相转移至另一 EP 管中, 加等体积的异丙醇, 轻轻混匀, - 20 $^{\circ}$ C 放置 2 h, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 加 700 μ L 75% 乙醇轻轻混匀, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min, 叩干, 加 20 μ L 去离子水溶解沉淀, - 80 $^{\circ}$ C 保存备用。电泳分析总 RNA 完整性并检测 RNA 的纯度和含量, 选用 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.8~ 2.0 的 RNA 用作反转录。

2.3.2 反转录制备模板 CDNA 抽取 8 μ g RNA 作为反转录模板, 加入 EP 管中, 依次加入 Random Primer 1 μ L, 无核酶水 10.52 μ L, 5 \times R. T. buffer 5 μ L, dNTP 2.5 μ L, RNasin 2 μ L, M-MLV 1 μ L, 总反应体系为 25 μ L。CDNA 的合成反应条件为 37 $^{\circ}$ C 反转录 50 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min 灭活反转录酶。反转产物于 - 80 $^{\circ}$ C 冰箱冻存备用。

2.3.3 目的基因的 PCR 扩增 VCAM-1mRNA 上下游引物序列^[2] 分别为: 上游引物: 5'-cgg tca tgg tca agt gtt tg-3', 下游引物: 5'-gag atc cag ggg aga tgt ca-3', 预计扩增基因片段长度为 570 bp。内参照 β -actin 上游

引物序列为 5'-gcc atg tac gta gcc atc ca-3', 下游为 5'-gaa ccg ctc att gcc gat ag-3', 预计扩增基因片断长度为 375 bp。以上引物均由上海中生生物公司合成。取反转录产物作为模板, PCR 反应混合物体积为 25 μ L, 包括反转录产物 2 μ L, 无核酶水 14.5 μ L, dNTP1 μ L, MgCl₂ 3 μ L, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, Taq DNA polymerase 1 μ L, 上游及下游引物各 1 μ L。按下列基本参数, 在 PCR 扩增仪上进行: 预变性 95 $^{\circ}$ C, 5 min, 变性 95 $^{\circ}$ C, 60 s, 退火 55 $^{\circ}$ C, 60 s, 延伸 72 $^{\circ}$ C, 60 s, 反应共进行 35 个循环, 末延伸 72 $^{\circ}$ C, 5 min。扩增目的片段长度为 570 bp。同时扩增大鼠 β -actin 用作内参照, 保证每次实验的相对可比性, 扩增的目的片段长度为 375 bp。

2.3.4 PCR 产物分析 取 RT-PCR 产物 4 μ L, 加上样缓冲液 1 μ L, 在 1.5% 琼脂糖凝胶(含 EB) 上电泳, 用 UVP 凝胶图像成像系统进行灰度扫描并拍摄打印实验结果, 用凝胶图像分析系统(Gel-Pro Analyzer Version 3.0) 分析结果, 并以 β -actin 校正作相对量分析, 数值以两者之间吸光度的比值表示。

2.4 统计学处理 所有数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 运用 SPSS11.5 统计软件进行处理。

3 结果

3.1 对血清脂质及脂蛋白的影响 结果见表 1。

3.2 对血清 SOD、MDA、ox-LDL 的影响 结果见表 2。

表 1 当归芍药散对血脂的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	n	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	LDL-C(mmol/L)	HDL-C(mmol/L)
正常对照组	—	10	2.08 \pm 0.37 ²⁾	0.45 \pm 0.04 ²⁾	0.33 \pm 0.03 ²⁾	1.89 \pm 0.43 ²⁾
模型组	—	9	8.50 \pm 2.12	0.82 \pm 0.06	1.42 \pm 0.18	1.18 \pm 0.20
DSS 高剂量组	28	10	4.62 \pm 0.93 ²⁾	0.55 \pm 0.09 ²⁾	0.55 \pm 0.02 ²⁾	3.26 \pm 0.75 ²⁾
DSS 低剂量组	14	9	4.95 \pm 0.94 ²⁾	0.59 \pm 0.11 ²⁾	0.59 \pm 0.05 ²⁾	3.18 \pm 0.42 ²⁾
血脂康组	0.12	10	4.71 \pm 1.01 ²⁾	0.57 \pm 0.10 ²⁾	0.61 \pm 0.02 ²⁾	3.17 \pm 0.61 ²⁾

注: 与模型组比较¹⁾ P < 0.05 ²⁾ P < 0.01(下同)

表 2 当归芍药散对 SOD、MDA、ox-LDL 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量(g/kg)	n	SOD(mmol/L)	MDA(mmol/L)	ox-LDL(μ g/dL)
正常对照组	—	10	822.98 \pm 48.84 ²⁾	3.80 \pm 0.33 ²⁾	12.46 \pm 4.08 ²⁾
模型组	—	9	383.89 \pm 48.09	7.44 \pm 0.50	90.74 \pm 15.82
DSS 高剂量组	28	10	657.30 \pm 80.44 ²⁾	4.58 \pm 1.34 ²⁾	61.85 \pm 17.89 ²⁾
DSS 低剂量组	14	9	652.71 \pm 79.29 ²⁾	4.65 \pm 0.39 ²⁾	66.36 \pm 11.02 ²⁾
血脂康组	0.12	10	647.74 \pm 78.68 ²⁾	4.84 \pm 0.37 ²⁾	69.17 \pm 13.54 ²⁾

3.3 对主动脉 VCAM-1mRNA 表达的影响

总 RNA 电泳分析可见清晰的 28 s 和 18 s 条带,且 28 s 条带的亮度和宽度约为 18 s 条带的 2 倍,OD260/OD280 值在 1.8~2.0 之间,证实 RNA 完整性较好。PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳条带清晰,可用于分析。其中模型组大鼠主动脉组织中 VCAM-1mRNA 的表达明显高于正常对照组 ($P < 0.01$),与模型组相比,DSS 高、低剂量组和血脂康组 VCAM-1mRNA 的表达均明显降低 ($P < 0.01$)。VCAM-1mRNA 电泳鉴定图见图 1,半定量分析数据用 VCAM-1 PCR 产物与 β -actin PCR 产物的吸光度的比值表示,结果见表 3。

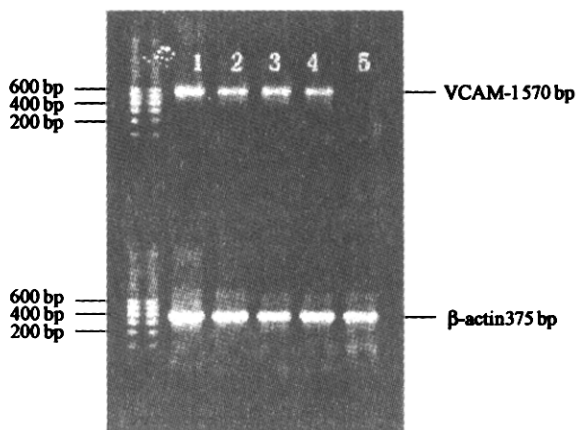


图 1 VCAM-1 基因表达

1. 模型组;2. 血脂康组;3. 当归芍药散低剂量组;
4. 当归芍药散高剂量组;5. 正常对照组

表 3 当归芍药散对 VCAM-1mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 (g/kg)	VCAM-1/ β -actin
正常对照组	—	0.00 \pm 0.00 ²⁾
模型组	—	1.21 \pm 0.15
DSS 高剂量组	28	0.43 \pm 0.08 ²⁾
DSS 低剂量组	14	0.48 \pm 0.20 ²⁾
血脂康组	0.12	0.45 \pm 0.13 ²⁾

4 讨论

血液单核细胞进入内膜是 AS 早期事件之一,单核细胞在离开血流迁入内膜之前,需接触并黏附于内皮。EC 功能受损时,分泌释出多种细胞因子如黏附因子、趋化因子等,与单核细胞相互作用,引导单核细胞黏附于内皮。现在已知循环血液中的细胞黏附分子(cAMS)是一类能介导细胞间以及细胞外基质黏附的蛋白,分属于 5 个家族,目前 cAMS 在 AS 发病机制中的作用日益受到关注。其中 VCAM-1 属于 cAMS 的免疫球蛋白超基因家族成员。正常情况下,动脉内皮几乎没有或仅有少量的 VCMA-1 表达,高脂血症则使其表达水平显著提高,这可能由于血

脂成分本身,尤其是 ox-LDL 可诱导 EC 表达 VCAM-1。VCAM-1 通过与血液单核细胞表面的整合素受体 (VLA-4) 结合,介导单核细胞黏附,并向内皮下迁移。迁移到动脉内膜的单核细胞转变为巨噬细胞,引导 AS 的进一步发展。

本实验中,正常组大鼠主动脉组织中几乎没有 VCAM-1mRNA 表达,而模型组 VCAM-1mRNA 表达明显升高,与模型组 TC、TG、LDL-C、ox-LDL 及 MDA 水平升高而 SOD 活性下降的变化趋势相一致。DSS 高、低剂量组均能降低主动脉内皮组织中 VCAM-1mRNA 的特异性表达,亦与其降血脂、抗脂质过氧化的作用效果相符。提示 DSS 有抗单核—内皮细胞黏附,防止 AS 进一步发展的作用,其机理可能与上述因素有关。

经方 DSS 由 3 血药(当归、芍药、川芎)和 3 水药(茯苓、白术、泽泻)组成,具有调肝理脾、祛痰除浊、和血化瘀之效。现代研究认为“痰浊证”的生化物质基础是血清脂类含量的增高,血清 TC、TG、LDL 水平可以作为痰浊证微观辨证的指标^[3]。自由基亦是体内代谢积累下来的“痰浊”^[4]。细胞黏附分子则可看作是血瘀证临床研究和基础研究的可靠指标,并认为其意义还在于体现了中医学关于血瘀证是“脉”和“血”共同作用的结果的观点^[5]。本研究通过实验观察表明了 DSS 调血脂、清除自由基、抗脂质过氧化及保护 VEC 功能、抗单核细胞黏附的作用与其祛痰浊化瘀血功效之间的内在统一性,并涉入分子生物学领域,从基因水平上探讨了其作用机制,为经方 DSS 用于临床阻抑 AS 的发生发展提供了可靠的理论依据。

[参考文献]

- [1] 阎艳丽,王鑫国,宋晓宇,等.当归芍药散对高脂血症家兔脂代谢及血液流变学的影响[J].辽宁中医杂志,2005,32(2):170-171.
- [2] 马爱玲,王宗仁,郑瑾,等.芪丹通脉片对实验性动脉粥样硬化大鼠动脉壁 ICAM-1、VCAM-1 基因表达的影响[J].第四军医大学学报,2004,25(4):355-358.
- [3] 孙建芝,牛晓亚,韩丽华,等.痰浊证微观辨证指标的实验研究[J].河南中医,1996,16(2):21-22.
- [4] 李以义,李普海,史玲,等.中医痰证现代化研究指标的探讨[J].中国中医基础医学杂志,1997,3(6):49-50.
- [5] 胡小青,陈利国.血管内皮细胞黏附分子与血瘀证相关性探讨[J].陕西中医,2005,26(3):249-250.