

• 药理 •

# 血府逐瘀汤对用血瘀证兔模型血清损伤的血管内皮细胞内分泌功能的影响

王 奇, 陈云波, 赖世隆, 梁伟雄, 温泽淮  
(广州中医药大学 DME 中心, 广州 510405)

**摘要:** 目的: 探讨血府逐瘀汤对用血瘀证兔模型血清损伤内皮细胞的保护作用, 阐明该方调节血管内皮细胞内分泌功能的作用机理。方法: 将正常组、血瘀模型组、血瘀+ 中药组和高脂血症组兔血清加入同批培养的正常兔主动脉内皮细胞中, 作用 24h 后, 观察细胞液中 ET、NO 的含量和 t-PA、PAI 及 AT-III 活性的变化。结果: 与正常血清组相比, 血瘀血清组细胞液中的 ET 和 NO 含量都明显升高, PAI 活性也明显升高, AT-III 活性则明显降低, t-PA 活性虽有下降趋势, 但无显著性意义; 而血瘀+ 中药血清组细胞液中的 ET 和 NO 含量以及 t-PA、PAI 和 AT-III 活性都未有明显改变。结论: 血府逐瘀汤能调节血瘀证兔模型血清对内皮细胞 ET/NO 的释放平衡作用和降低其对抗凝、纤溶功能的影响, 对内皮细胞起到一定的保护作用。

**关键词:** 血府逐瘀汤; 内皮; 血管; 细胞培养

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2002)02-0012-03

## Effects of Xuefu Zhuyu Decoction on Endocrine Function of the Vascular Endothelial Cells Injured by Rabbit Stasis Syndrome Serum

WANG Qi, CHEN Yun-bo, LAI Shi-long, LIANG Wei-xiong, WEN Ze-huai

(Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**Abstract:** To investigate the protective effects of Xuefu Zhuyu (XEZY) decoction on the vascular endothelial cells injured by rabbit blood stasis syndrome (BSS) serum and its effects of improvement on the endocrine dysfunction, we used the 4 different kinds of rabbit serum (normal, BSS with absorbed XFZY, hyperlipemic) to cultured rabbit vascular endothelial cells *in vitro*. The concentrations of endothelin (ET), nitric oxide (NO) and the activity of tissue-type plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor (PAI), antithrombin III (AT-III) in cultured supernatant were detected at 24 hour, respectively. Results show the levels of ET, NO and the activity of PAI, except for t-PA, increased significantly in the BSS serum group, as compared with normal serum group. No significant differences of these vasoactive substance levels in cultured supernatant between normal and BSS with XFZY decoction. These results indicate that XFZY decoction can improve the endocrine dysfunction of the endothelial cells and protect cultured endothelial cells injured by rabbit BSS serum *in vitro*.

**Key words:** Xuefu Zhuyu Decoction; Blood Stasis; Endothelial cells; Vasoactive substance

我们在对王清任的血府逐瘀汤的基础研究中发现, 该方能调节血瘀证动物模型体内血管内皮细胞的内分泌功能<sup>[1]</sup>, 初步提示这可能是该方治疗血瘀证及血栓形成性疾病的重要机理之一。本实验通过比较血瘀证兔模型血清与灌服血府逐瘀汤后的血瘀证兔血清对体外培养内皮细胞的不同作用, 观察由内皮细胞分泌的内皮素(ET, Endothelin)、一氧化氮

(NO, Nitric oxide)、组织型纤溶酶原激活物(t-PA, Tissue-type plasminogen activator)及其抑制剂(PAI, Plasminogen activator inhibitor)、抗凝血酶 III(AT-III, antithrombin III)等血管活性物质的变化, 进一步从体外实验探索血府逐瘀汤对血瘀证兔模型血清损伤内皮细胞的保护作用。

### 1 材料

**1.1 动物** 雄性新西兰纯种兔(1kg 左右), 购自广东省卫生厅医用实验动物场。

**1.2 试剂** 199 培养液、胎牛血清为 Gibco 产品, 胶

收稿日期: 2001-08-20

基金项目: 国家自然科学基金(3927081); 广东省科委自然科学基金(91189)

原酶( II 型) 购自 Sigma 公司, 胰蛋白酶购自 EML 公司。牛血清白蛋白由新疆生化厂生产, 去甲肾上腺素由广州明兴制药厂生产。ET 碘标记放免药盒由解放军总医院东亚所提供, NO 测试盒由军事医学科学院放射医学研究所提供, t-PA、PAI 活性测定试剂盒由上海医科大学分子遗传研究室提供, AT- II 活性测定试剂盒由卫生部上海生物制品研究所提供。

**1.3 药物** 血府逐瘀汤处方中药材购自广州市药材公司, 并经本校中药系鉴定, 确定其品种、产地、药物剂量按原方比例。桃仁 1000g, 红花、当归、生地、黄芩、怀牛膝各 760g, 赤芍、枳壳各 500g, 川芎、桔梗各 420g, 柴胡、甘草各 250g。将药材混匀后, 按 1: 4 (生药量: 水) 比例加水 25500ml, 浸没 30min 后, 煎煮 2 次, 每次 0.5h, 合并煎液, 共煎取 12000ml, 过滤, 于水浴浓缩至 4500ml, 生药含量为 1.4g/ml, 灭菌冷藏备用。

## 2 方法

**2.1 正常兔主动脉血管内皮细胞培养** 根据 Jaffe 的报道<sup>[2]</sup> 及我们改进后的兔主动脉内皮细胞培养方法, 取若干只正常新西兰兔的主动脉内皮细胞进行体外培养, 以传至第 5 代的细胞作实验对象。

**2.2 实验血清的制备** 20 只新西兰兔随机均分为正常对照组、血瘀模型组、血瘀+ 中药组和高脂血症组。按我们以前报道的血瘀证兔模型造模方法<sup>[3]</sup>, 对血瘀造型组和血瘀+ 中药组进行造模。于兔耳静脉缓慢注射去甲肾上腺素 0.1mg/kg/日, 连续 20d; 于造模第 1d 同时静注牛血清白蛋白 250mg/kg, 间隔 10d, 再注射 1 次, 共 2 次。正常对照组于同期注射等量生理盐水。血瘀+ 中药组于造型后第 1d 开始予以血府逐瘀汤浓缩液, 按 10ml/kg/日剂量(生药含量为 1.4g/ml) 进行灌胃, 连续 10d。正常对照组和血瘀造型组于同期灌服等量生理盐水。灌药结束后(第 31d) 2h, 抽取各组兔血清, 除菌过滤及灭活后, 低温保存备用。另按高脂兔模型饲料配方<sup>[4]</sup> 喂养数只新西兰兔, 40d 后抽血检测胆固醇浓度后, 收集血清备用(胆固醇水平为 11.5mmol/L)。

## 2.3 各组实验培养液的配制

**2.3.1 正常血清组:** 正常兔血清 10%, 胎牛血清 10%, 加 M-199 80%。

**2.3.2 血瘀血清组:** 血瘀兔血清 10%, 胎牛血清 10%, 加 M-199 80%。

**2.3.3 血瘀+ 中药血清组:** 模型兔灌血府逐瘀汤后的血清 10%, 胎牛血清 10%, 加 M-199 80%。

**2.3.4 高脂血清组:** 高脂兔血清 10%, 胎牛血清 10%, 加 M-199 80%。

**2.4 各组血清应用于培养的内皮细胞** 将传至第 5 代的 32 瓶已呈单层融合的内皮细胞随机均分为四组, 吸出原有的培养液, 分别对应加入上述四种实验培养液, 静置培养 24h 后, 收集培养液, 4℃离心低温保存。

**2.5 ET、NO 含量测定** ET-1 检测按碘标记放免药盒说明书操作, 使用 Beckman Gamma5500 自动计数器, 采用非平衡放射免疫法直接测定细胞液 ET-1 含量, 结果以 pg/ml 表示。检测 NO 时按药盒说明书进行操作, 使用 Pharmacia4000 型紫外分光光度计检测血浆中 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (NO 稳定的代谢产物之一) 含量, 以 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 含量表示 NO 生成量, 结果以 μmol/L 表示。

**2.6 t-PA、PAI 活性测定** t-PA、PAI 活性测定采用底物发色分析法, 酶标仪为 Bio-Rad 3550 型, 测定样本在 400nm 处的吸光值。血浆 t-PA、PAI 活性分别以 IU/ml 和 AU/ml 表示。

**2.7 AT- II 活性测定** AT- II 的活性测定用凝血酶凝块空斑法。以 % 表示其活性的对数值。

**2.8 数据处理** 各组数据用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用单因素方差分析。经方差齐性检验后, 方差齐时采用 Newman-Keuls 检验法; 若方差不齐时, 采用秩和检验 Nemenyi 法。

## 3 结果

**3.1 各组培养液中 ET、NO 水平检测结果(表 1)** 结果表明, 经各组兔血清 24h 处理后, 与正常血清组相比, 血瘀血清组细胞液中的 ET 和 NO 含量都明显升高, 血瘀+ 中药血清组细胞液中的 ET 和 NO 含量都未有明显改变, 高脂血清组细胞液中的 ET 和 NO 含量虽然分别比正常血清组升高和降低, 但无显著性差异。与血瘀血清组相比, 血瘀+ 中药血清组中的 ET 和 NO 含量都明显降低, 高脂血清组中的 ET 和 NO 含量也都分别比血瘀血清组低。

表 1 各组培养液中的 ET、NO 含量

组别	例数	ET (pg/ml)	NO (μmol/M)
正常血清组	8	326.61 ± 122.6	19.02 ± 3.26
血瘀血清组	8	662.86 ± 171.46 <sup>**</sup>	31.41 ± 6.18 <sup>**</sup>
血瘀+ 中药血清组	8	378.56 ± 209.54 <sup>#</sup>	16.97 ± 4.20 <sup>#</sup>
高脂血清组	8	503.33 ± 35.54 <sup>#</sup>	15.00 ± 3.94 <sup>#</sup>

注: 与正常血清组比较<sup>\*\*</sup> P < 0.01; 与血瘀血清组比较<sup>#</sup> P < 0.01, <sup>#</sup> P < 0.05

**3.2 各组培养液中 t-PA、PAI、AT- II 活性检测结果(表 2)**

表 2 各组培养液中 t-PA PAI AT- II 的活性

组别	t-PA(U/ml)	PAI(AU/ml)	AT- II (%)
正常血清组	0.103 ± 0.041	1.791 ± 0.817	33.2 ± 8.8
血瘀血清组	0.078 ± 0.022	3.583 ± 1.948*	23.9 ± 6.1*
血瘀+ 中药血清组	0.105 ± 0.50	1.763 ± 1.036	28.8 ± 8.8
高脂血清组	0.087 ± 0.017	4.164 ± 2.233*	24.3 ± 7.0

注:与正常血清组比较\* P < 0.05; n = 8

结果表明,经各组兔血清 24h 处理后,与正常血清组相比,血瘀血清组和高脂血清组细胞液中的 PAI 活性都明显升高,AT- II 活性明显降低,t-PA 活性虽有下降趋势,但都无显著性意义;血瘀+ 中药血清组细胞液中的 t-PA PAI 和 AT- II 活性也都未有明显改变。

#### 4 讨论

血府逐瘀汤的近代研究表明,该方具有抗凝、纤溶功能,能防止血栓形成,舒张及改善微循环。我们曾用该方治疗实验性血瘀证兔模型,发现其是通过改善模型动物体内血管内皮细胞的内分泌功能,从而达到理气活血的治疗效果<sup>[1]</sup>。体内实验因受神经、体液等众多因素的影响,所得到的结论对活血化瘀治疗机理的阐明受到一定的限制。本实验通过比较血瘀证兔模型血清与灌服血府逐瘀汤后的该模型兔血清对体外培养的内皮细胞的作用,来进一步阐明血府逐瘀汤调节血管内皮细胞内分泌功能的作用机理。

ET 主要由血管内皮细胞合成和释放,具有强烈的收缩血管作用,能广泛作用于各种哺乳动物的各类血管平滑肌,使其张力增加,血管收缩<sup>[5]</sup>;而 NO 则是血管内皮细胞分泌的一种具有舒张血管、抑制血小板聚集的信使分子<sup>[6]</sup>。由内皮细胞内的组成型一氧化氮合酶(constitutive nitric oxide synthase, cNOS)催化合成,内皮细胞通过控制 ET 和 NO 的释放平衡来实现调节血管舒缩运动功能。有临床研究证实<sup>[7]</sup>,ET/NO 比例失调则有可能导致体内血管内皮细胞内分泌功能紊乱、血管内皮受损及通透性改变,同时还会引发血液成分、血流变性的变化,表现为血瘀证的特性。

本实验结果表明,血瘀证兔模型血清使正常培养的内皮细胞分泌的 ET 含量明显升高,推测血瘀证兔模型中的有害成分(如因注入牛血清白蛋白而形成的免疫复合物等)类似于高脂血症兔血清中的胆固醇,具有能使血管内皮细胞内分泌功能紊乱的作用,这也与我们过去在血瘀证兔模型体内血浆中测得较高的 ET 水平相吻合<sup>[1]</sup>。令人关注的是,与高脂

兔血清不同,血瘀兔模型血清的作用不但未使内皮细胞分泌的 NO 水平下降,反而导致培养液中的 NO 含量明显上升。这可能是由于体外培养的内皮细胞中 NOS 的另一种异构体-诱导型 NOS(iNOS)被激活而释放 NO,过量的 NO 同样可导致细胞的损伤及内分泌功能的紊乱。通过本次实验,我们发现用经血府逐瘀汤治疗后的模型兔血清处理后,培养的内皮细胞分泌的 ET NO 水平明显下降,与正常血清组相比,均无显著性差异;而与血瘀证模型兔血清组比较,有显著性差异。这说明该方能调节因模型兔血清造成的内皮细胞 ET NO 的过度释放,抑制体内局部血管舒缩异常的发生。

在各种哺乳动物体内,由血管内皮细胞合成的 AT- II 是一种多功能的丝氨酸蛋白酶抑制物,能灭活凝血因子,具有抗凝作用;t-PA 和 PAI 则是内皮细胞分泌的一对能调节血液纤溶功能的血管活性物质,t-PA/PAI 的平衡在维持血流通畅方面具有重要意义<sup>[8]</sup>。血瘀证患者或动物模型体内正是由于血管内皮细胞受损,抗凝、纤溶功能失调,导致产生高凝、高聚、高粘的病理状态。本次内皮细胞的体外实验进一步表明,血瘀兔模型血清和高脂兔血清都能促进血管内皮细胞产生 PAI 并抑制 AT- II 的分泌,而血府逐瘀汤灌服后的血瘀证兔模型血清则无此作用,说明该方能降低模型血清对血管内皮细胞抗凝和纤溶功能的影响,从而对内皮细胞起到一定的保护作用。

#### 参考文献:

- [1] 王奇,陈云波,梁伟雄,等.血瘀证兔模型血管内皮细胞内分泌功能变化及血府逐瘀汤作用的影响[J].中国中医基础医学杂志,1998,4(6):31-34.
- [2] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins- Identification by morphological and immunologic criteria[J]. J Clin Invest, 1973, 52: 2745-2756.
- [3] 陈云波,王奇,王培训,等.血瘀证兔模型血管内皮细胞培养的形态结构改变初探[J].中国中医基础医学杂志,1999,5(5):12-16.
- [4] 徐叔云.药理实验方法学[M].第2版,北京:人民卫生出版社,1991.1047-1051.
- [5] Yanagisawa M, Kurlbaa H, Kimura S, et al. A novel vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells[J]. Nature, 1988, 332: 411-415.
- [6] Moncada S, Higgs A. Mechanisms of disease. The L-Arginine nitric oxide pathway[J]. New Engl J Med, 1993, 329: 2002-2012.
- [7] 蔡钦朝,汪琼华,吴云智,等.血瘀证患者血管内皮内分泌功能的观察[J].安徽中医学院学报,1998,17(2):61-63.
- [8] 韩启德,文允猛.血管生物学[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997.24-38.