

4 讨论

活血通络,滋阴补血,平肝潜阳为中医治疗高血压的常用方法。血虚血行壅滞,血瘀内停,血行缓慢而发眩晕,以四物汤为主加味组成的养血清脑颗粒具有滋阴补血,平肝潜阳,活血通络之效,共奏降压之功。养血清脑颗粒由当归、熟地、川芎、珍珠母、决明子、夏枯草、白芍等组成,现代研究认为当归能降低血小板聚集,抗血栓形成,扩张外周血管,缓解血

管平滑肌痉挛;熟地有一定降压作用;川芎抑制血管平滑肌收缩,降低外周血管阻力;珍珠母镇惊安神,调节中枢降压;决明子对动物有降压作用;夏枯草具有降压活性;白芍解除血管平滑肌痉挛,有轻度降压作用。诸药合用可干预血管壁平滑肌细胞膜的钙通道,扩张血管口径,舒张阻力血管,并通过调节中枢神经,对抗去甲肾上腺素引起的收缩而起降低血压作用。

黄芩茎叶总黄酮对动脉粥样硬化早期病理改变的影响

于永芳¹,高瑞峰^{2*},李沈明^{3*}

(1. 承德医学院中药研究所,河北承德 067000; 2. 承德医学院附属医院 河北承德 067000; 3. 承德颈复康药业集团公司,河北承德 067000)

黄芩具有清热燥湿、泻火解毒作用,其有效成分为黄酮类化合物,具有抗炎、螯合金属离子和清除超氧阴离子等药理作用^[1]。传统上黄芩以根部入药,但野生资源非常有限。承德医学院河北省中药研究与开发重点实验室进行了黄芩茎叶总黄酮的药理试验,证实黄芩茎叶总黄酮具有降低血胆固醇作用,初步的临床研究表明黄芩茎叶总黄酮对高血脂有一定的防治作用。本实验旨在观察黄芩茎叶总黄酮对低密度脂蛋白(LDL)氧化修饰及对氧化低密度脂蛋白(Ox-LDL)所致血管内皮细胞(EC)损伤的影响。

1 材料

1.1 药品:黄芩茎叶总黄酮由河北省中药研究与开发重点实验室提供(含量为85%)。EC生长因子购于Boehringer Mannheim公司。RPMI1640购于Gibco公司。四已氧基丙烷购于Sigma公司。淋巴细胞分离液购于中国医学科学院天津血液病研究所。VIII因子抗体和羊抗兔荧光抗体购于中山公司。

2 方法

2.1 LDL的分离提取及氧化修饰:取健康人新鲜血浆,用一次密度梯度法分离制备LDL^[2],LDL氧化修饰采用硫酸铜法^[3],硫代巴比妥酸法^[3]鉴定LDL氧化修饰程度,用四已氧基丙烷作标准,结果以LDL蛋白中MDA(丙二醛)含量表示(nmol/mg)。Ox-LDL的值显著高于正常LDL 5倍以上。

2.2 对Cu²⁺诱导的LDL氧化修饰的影响:用PBS调节LDL浓度为100 mg蛋白/L,加入不同浓度的黄芩茎叶总黄酮(25, 50, 100 mg/L),混匀后,加入CuSO₄使其终浓度达5 μmol/L,37℃水浴2.5 h,加入0.1 mmol/L的EDTA冰水浴终止反应。紫外分光光度计鉴定共轭双烯生成量^[4](以吸光度A_{234nm}值表示),硫代巴比妥酸法检测MDA生成量。

2.3 人脐静脉EC的培养、鉴定及细胞毒性实验:参照Jaffo^[5]培养EC方法,用胰蛋白酶取代胶原酶。人脐静脉EC的鉴定采用人第VIII因子荧光抗体检验鉴定。为确定黄芩茎叶总黄酮(TFSLSBG)对人血管EC作用的最佳剂量,用25, 50, 100, 200 mg/L黄芩茎叶总黄酮处理人脐静脉EC,观察48 h细胞存活情况,选用48 h内无毒性反应的最大剂量为最大无毒作用剂量。

2.4 对Ox-LDL所致EC损伤实验:取接种于24孔板、生长状态良好的EC,换含5%胎牛血清(FBS)的RPMI-1640培养液1 mL(对照组)和不同浓度(25, 50, 100 mg/L)的黄芩茎叶总黄酮、Ox-LDL(100 mg/L)等实验因子的培养液(实验组)于37℃温育12 h,台盼蓝法计算细胞存活率(每组计2孔,每组计算3次),并测定乳酸脱氢酶(LDH)含量^[6]。

2.5 单核细胞-内皮细胞(MC-EC)黏附实验:密

* 收稿日期:2003-01-03

作者简介:于永芳(1948-),男,河北秦皇岛人,副主任药师,市级拔尖人才,获省科委二等奖1项,三等奖2项,四等奖1项,获市科委一等奖4项,研究方向为中药药理。Tel (0314) 2062312-8348 E-mail yuyongfangcnrci@yahoo.com.cn

* 通讯作者

度梯度离心法分离单核细胞^[7]。将接种于 24孔板,生长状态良好已融合的 EC,用 RPMI-1640培养液 1 mL (对照组)和含不同浓度 (25, 50, 100 mg/L)的黄芩茎叶总黄酮、Ox-LDL (100 mg/L)等实验因子的培养液 (实验组)于 37℃ 温育 24 h,然后吸出培养液, PBS洗 1次,再加含 1×10^6 /mL单核细胞 (MC)的 RPMI-1640培养液, 37℃ 温育 1 h,用 FBS洗去未黏附的 MC,以 6 mol/L NaOH溶解细胞,测蛋白含量,以不加 MC的培养孔内蛋白含量为基础,计算 MC黏附率。

黏附率 = [(EG+ MC)蛋白量 - EC蛋白量] / 1 mL MC蛋白量 × 100%

2.6 统计学分析:结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析和 *t* 检验

3 结果

3.1 对 EC的毒性:细胞计数法观察结果表明,在低于 150 mg/L时,细胞存活率能维持较高水平 (90% 以上),而 150 mg/L以上浓度时细胞存活率明显下降,至 200 mg/L接近 60% 死亡。因此,以 25, 50, 100 mg/L为体外试验浓度

3.2 对 Cu²⁺ 诱导的 LDL氧化修饰的影响:见表 1 可见,黄芩茎叶总黄酮在浓度为 50, 100 mg/L时,可明显抑制 LDL的氧化 ($P < 0.05$),并且抑制强度与剂量成良好的相关性。

表 1 黄芩茎叶总黄酮对 Cu²⁺ 诱导的 LDL氧化的影响

Table 1 Effect of TFSLSBG on oxidation of LDL induced by Cu²⁺

组别	剂量 / (mg·L ⁻¹)	A _{234nm}	MDA / (nmol·mg ⁻¹)
LDL	-	0.18 ± 0.015	2.89 ± 0.25
LDL+ Cu ²⁺	-	0.62 ± 0.067	26.22 ± 2.21
黄芩茎叶总黄酮+ LDL+ Cu ²⁺	25	0.51 ± 0.031*	22.83 ± 2.06
	50	0.28 ± 0.032*	14.60 ± 21.34*
	100	0.22 ± 0.027*	9.22 ± 0.95*

与 LDL+ Cu²⁺ 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs LDL+ Cu²⁺ group

3.3 对 Ox-LDL所致 EC损伤的影响:见表 2 可见,黄芩茎叶总黄酮在浓度为 25, 50, 100 mg/L时,可明显提高 EC存活率,并呈剂量关系。

3.4 对 MC-EC黏附的影响:见表 3 可见,黄芩茎叶总黄酮在浓度为 50, 100 mg/L时,可明显降低 MDA的生成 ($P < 0.05$),抑制 MC向 EC黏附。

4 讨论

动脉内皮长期反复损伤及其功能障碍是动脉粥样硬化 (AS) 病变形成的始动环节^[8]。研究表明, LDL发生氧化修饰,生成的 Ox-LDL是引起内皮损

表 2 黄芩茎叶总黄酮对 Ox-LDL所致 EC损伤的影响

Table 2 Effect of TFSLSBG on cultured EC injury induced by Ox-LDL

组别	剂量	EC存活率		LDH
	/(mg·L ⁻¹)	%	%	%
对照	-	100.0 ± 0.04	17.64 ± 1.65	
LDL	-	98.2 ± 0.72	21.35 ± 2.36	
Ox-LDL	-	35.2 ± 3.97	65.33 ± 4.37	
黄芩茎叶总黄酮+ Ox-LDL	25	81.4 ± 3.53*	42.24 ± 4.11*	
	50	89.3 ± 2.15*	31.14 ± 3.43*	
	100	95.2 ± 1.02*	24.67 ± 4.27*	

与 Ox-LDL组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Ox-LDL group

表 3 黄芩茎叶总黄酮对 MC-EC黏附率和 MDA的影响

Table 3 Effect of TFSLSBG on sticking rate of MC-EC and MDA content

组别	剂量	MC-EC	MDA
	/(mg·L ⁻¹)	黏附率 %	/(nmol·mg ⁻¹)
LDL	-	4.03 ± 0.31	1.10 ± 0.18
Ox-LDL	-	6.87 ± 0.62	2.54 ± 0.33
黄芩茎叶总黄酮+ Ox-LDL	25	28.64 ± 2.48*	15.3 ± 1.48*
	50	21.75 ± 2.84*	9.39 ± 1.56*
	100	9.83 ± 1.36*	6.80 ± 0.68*

与 Ox-LDL组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs Ox-LDL group

伤的一个重要因子, Ox-LDL可通过对 EC的毒性作用、化学趋化作用、免疫源性和影响细胞因子的表达等细胞生物学效应而促进 AS的发生与发展^[9]。Ox-LDL可被巨噬细胞上的清道夫受体摄取,导致细胞内大量胆固醇蓄积,形成泡沫细胞, Ox-LDL以及氧化的胆固醇对细胞具有毒性作用,最终导致细胞坏死,堆积形成斑块,引起管腔狭窄,进而引起心血管疾病。因此,增强机体内的抗氧化功能,阻断脂质过氧化反应,防止氧化损伤是预防 AS的重要策略。

本实验应用体外细胞筛选方法,观察到黄芩茎叶总黄酮在体外抑制 LDL的氧化修饰,阻止 Ox-LDL对 EC的损伤,降低 MC-EC黏附率。其机制一方面是黄芩茎叶总黄酮的抗氧化作用,另一方面是通过直接作用于 EC,调节 EC功能,增强 EC对有害物质的抵抗力和耐受性,从而保护 EC免受损伤。本研究为黄芩茎叶总黄酮的开发利用、用于预防 AS提供了实验依据,为进一步研究其功能和临床应用打下基础。

References

[1] Chang W S, Lee Y J, Lu F J, et al. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase [J]. *Anticancer Res*, 1993, 13: 2165-2170.
 [2] Martin A, Frei B. Both intracellular and extracellular vitamin C inhibit atherogenic modification of LDL by human vascular endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,

1997, 17: 1583-1590.
 [3] Miura S, Watanabe J, Tomita T, *et al.* The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu²⁺ mediated oxidative modification of low density lipoprotein [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(12): 1567-1572.
 [4] Pryor W A, Castal L. Chemical methods for the detection of lipid hydroperoxides [J]. *Methods Enzymol*, 1984, 105(34): 293-299.
 [5] Jaffe E A. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973, 52: 2745.

[6] Li J, Liu Q H, Jiang L *et al.* Apolipoprotein CIII antagonize the damage on endothelium induced by low-lipid lipoprotein [J]. *Chin J Arterioscler* (中国动脉硬化杂志), 1997, 5(1): 32-36.
 [7] Fogelman A M. Modification of the recall method for the isolation of human monocytes [J]. *J Lipid Res*, 1988, 29: 243-246.
 [8] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis; a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, 362: 801-809.
 [9] Justin W. The oxidation hypothesis of atherosclerosis: an update [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 1997, 27(1): 1.

芪丹通脉片对肿瘤坏死因子- α 诱导的心肌细胞的 细胞间黏附分子-1 表达的影响

王宗仁¹, 肖铁舟¹, 李晶华¹, 马静¹, 邵中军², 郑瑾¹, 马爱玲^{1*}

(1. 第四军医大学附属西京医院 中医科, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学 流行病学教研室, 陕西 西安 710032)

近年来, 冠心病发生发展中的细胞黏附机制日益受到重视, 其中内皮细胞 (EC), 白细胞和血小板之间以及与血管内皮基质间相互黏附、相互作用而导致炎症反应和促凝异常、血栓形成, 从而促进冠心病的形成和发展, 而黏附分子和黏附蛋白是介导细胞黏附的分子基础。研究发现, 细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 参与中性粒细胞黏附心肌细胞, 释放细胞毒过程, 在心肌细胞坏死过程中起关键作用。一些细胞因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α), γ 干扰素 (IFN- γ), 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1), 白细胞介素-1 (IL-1), 白细胞介素-6 (IL-6), 脂多糖 (LPS) 和佛波酯 (PMA) 等可促进上皮细胞和血管平滑肌等细胞 ICAM-1 的表达, 其中 TNF- α 的作用尤其引人注目^[1]。本研究观察芪丹通脉片 (QDTMP) 对 TNF- α 诱导的培养乳鼠心肌细胞 ICAM-1 表达的影响, 探讨中药复方制剂对冠心病发生发展中的细胞黏附过程的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料: SD 大鼠 30 只, 雄性, 体重 (220 \pm 18) g, 第四军医大学实验动物中心提供。DMEM 胰蛋白酶、胎牛血清 (FBS)、TNF- α 抗 ICAM-1 多抗及 DAB 染色剂购于武汉博士德公司。生物素标记羊抗兔抗体 (二抗), ABC 复合物, 第四军医大学神经生物教研室提供。芪丹通脉片提取浸膏干粉 (1 g 干粉相当于生药 2.862 g), 由第四军医大学附属西京医院提供。

1.2 含药血清制备: SD 大鼠按体重随机分成: 对照组、芪丹通脉片低、高剂量组。对照组 ig 生理盐水 10 mL/kg, 芪丹通脉片低、高剂量组分别 ig 1, 2 g 生药/kg; 连续 7 d 第 8 天断头取血, 离心, 取血清, 分装保存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.3 心肌细胞原代培养: 新生 1~3 d SD 大鼠 (第四军医大学实验动物中心提供), 雌雄兼用, 活杀取心室, 除去心包膜, 放入不含钙、镁的 Hanks 液中漂洗 2 次, 洗去多余水分, 剪成 1~2 mm³ 组织碎块, 置于 0.2% 胰蛋白酶溶液中, 37 $^{\circ}$ C 水浴振荡消化 15~20 min, 200 目不锈钢筛滤过, 将上层细胞悬液吸入含 10% FBS DMEM 培养基的消毒离心管中混匀, 800~1000 r/min 离心 10 min, 离心后弃上清液, 加入不含钙、镁 Hanks 液混匀, 800~1000 r/min 离心 10 min, 离心后弃上清液, 加 4 mL 培养液混匀, 接种在消毒的载玻片上, 37 $^{\circ}$ C 孵箱中静置 3 h, 调整细胞浓度为 5×10^5 /L, 吸入含 10% FBS 的 DMEM 培养基转入培养皿 37 $^{\circ}$ C CO₂ 孵箱中培养, 并观察细胞生长状况。48 h 后换液备用。

1.4 分组: 加用 TNF- α 和芪丹通脉片, 换液时将培养的心肌细胞随机分为 3 类, 一类在含 10% FBS 的 DMEM 中分别加入 TNF- α (100 U/mL), 另一类在 10% 高剂量含药血清的 DMEM 中加入 TNF- α (100 U/mL), 第三类在含 10% 低剂量含药血清的 DMEM 中加入 TNF- α (100 U/mL), 均刺激 6, 12, 24 h

* 收稿日期: 2003-03-14
 基金项目: 陕西省重点课题 (2001K12-G7)
 作者简介: 王宗仁 (1951-), 男, 博士生导师, 第四军医大学附属西京医院中医科主任
 Tel: (029) 3375347 E-mail: zongren@fmmu.edu.cn