

BrdU-EL ISA 法测定四逆汤及组方药提取物 对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响

刘平¹, 葛迎春¹, 李晨燕¹, 马天舒¹, 任慧君¹, 徐亚娟², 徐东铭^{2*}

(1. 大连市中医研究所 药理研究室, 辽宁 大连 116013; 2. 吉林省中医中药研究院 植物化学研究室, 吉林 长春 130021)

摘要: 目的 观察四逆汤 (SNT) 及组方药提取物对大鼠主动脉血管平滑肌细胞 (VSMC) 增殖的影响。方法 采用 MTT 比色法和 BrdU-EL ISA 法观察药物对离体大鼠 VSMC 增殖的影响。结果 BrdU-EL ISA 法结果表明四逆汤总提取物 (EST) 对 VSMC 的 BrdU 掺入 DNA 没有显著影响, 而 MTT 测定表明 EST 可以提高 VSMC 的脱氢酶活性。甘草 (LE)、附子 (AE)、干姜 (GE)、甘草加附子 (LAE)、干姜加附子 (AGE) 提取物显著提高 VSMC 的脱氢酶活性, 同时提高 VSMC 的 BrdU 掺入 DNA 的水平。结论 EST 可以增加 VSMC 的脱氢酶活性, 但对 VSMC 的 BrdU 掺入 DNA 的水平无影响。而其他组方药提取物可以增加 VSMC 的脱氢酶活性, 同时提高 VSMC 的 BrdU 掺入 DNA 的水平。

关键词: 四逆汤; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 5-溴-2-脱氧尿苷 (BrdU)

中图分类号: R 286.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0054-04

Effect of extracts from Sini Tang and its component drugs by BrdU-EL ISA on proliferation of rat vascular smooth muscle cell in vitro

LIU Ping¹, GE Ying-chun¹, LI Chen-yan¹, MA Tian-shu¹,

REN Hui-jun¹, XU Ya-juan², XU Dong-ming²

(1. Department of Pharmacology, Institute of Traditional Chinese Medicine of Dalian, Dalian 116013, China;

2. Department of Phytochemistry, Academy of Traditional Chinese Medicine and
Materia Medica of Jilin Province, Changchun 130021, China)

Abstract: **Object** To observe the effect of extracts from Decoction for Resuscitation (Sini Tang) (EST) and its component drugs on proliferation of rat vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Using methyl thiazolyl tetrazolium assay (MTT assay) and bromodeoxyuridine (BrdU) ELISA, to investigate the effect of drugs on proliferation of VSMC *in vitro*. **Results** The results indicated that EST increased dehydrogenase activity (MTT assay) but had no effect on BrdU incorporation in DNA in VSMC. Prepared licorice root extracts (LE), aconite root extracts (AE), dried ginger extracts (GE), extracts of prepared licorice root and aconite root (LAE), extracts of aconite root and dried ginger (AGE) increased dehydrogenase activity and BrdU incorporation in DNA in VSMC of rat. **Conclusion** EST increased dehydrogenase activity but had no effect on BrdU incorporation in DNA in VSMC. LE, AE, GE, LAE, AGE increased dehydrogenase activity and BrdU incorporation in DNA in VSMC of rats.

Key words: Decoction for Resuscitation (Sini Tang, SNT); vascular smooth muscle cells; cell proliferation; bromodeoxyuridine (BrdU)

四逆汤 (SNT) 出自《伤寒论》, 由附子、干姜、甘草 3 味药组成, 功效为回阳救逆, 是用于治疗少阴虚寒证的主方。现代药理学和化学研究已经对 SNT 的药理作用和物质基础有了较深入的认识, 研究者从单味药有效成分的组合^[1,2]到 SNT 新的药理作用等方面进行了大量的实验研究^[3,4], 有关 SNT 的作用机制和物质基础研究日益深入。本研究

以心血管药物作用机制研究方法, 建立相应实验模型, 以酚妥拉明 (Phe) 和去甲肾上腺素 (NA) 为对照, 以血管平滑肌细胞 (VSMC) 的增殖为观察指标, 研究比较 SNT、单味药及组合药提取物药理活性的特点和差别, 探讨 SNT 配伍使用的作用机制。

1 材料

1.1 药品: SNT 及组方药提取物样品由吉林省中

* 收稿日期: 2003-05-09

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (39930210)

作者简介: 刘平 (1951—), 男, 吉林省长春市人, 研究员, 硕士生导师, 主要从事中药有效成分的筛选及作用机制的研究, 发表学术论文 50 余篇。Tel: (0411) 2671824 E-mail: ddbc@mail.dlptt.ln.cn

医中药研究院提供。四逆汤总提取物 (EST, 94 g 生药/g)、甘草提取物 (LE, 83 g 生药/g)、附子提取物 (AE, 358 g 生药/g)、干姜提取物 (GE, 373 g 生药/g)、甘草加附子提取物 (LAE, 271 g 生药/g)、干姜加附子提取物 (AGE, 539 g 生药/g)。酚妥拉明 (Phetolamine, Phe), 瑞士。去甲肾上腺素 (noradrenaline, NA), 上海禾丰制药厂 (批号: 991001)。

1.2 动物: Wistar 大鼠, 体重 100~120 g, 雌雄兼用, 购于大连医科大学实验动物中心。

1.3 试剂: Eagle's MEM 培养基 (Gibco, 美国); 胰蛋白酶 (Gibco, 美国); II 型胶原酶 (Sigma, 美国); 96 孔培养板 (Costar, 美国); BrdU 标记及检测试剂盒 (Roche, 德国); 四甲基偶氮唑盐 (MTT, Sigma, 美国); 胎牛血清 (中国医学科学院血液病研究所, 批号 200004); 其余试剂均为国产分析纯。

1.4 仪器: 自动酶标光度计 (ClinBio 128C, EC); CO₂ 培养箱 (SANYO, MCO-175M, 日本)。

2 方法

2.1 VSMC 原代培养: 无菌条件下取大鼠胸主动脉至腹主动脉一段, 在培养皿中撕弃外膜, 剪开动脉腔, Hank's 液冲洗。置青瓶中, 经 0.25% 胰蛋白酶消化 30 min, 吹打除去内皮细胞。用 Hank's 液冲洗 3 次后, 剪成 1 mm³ 组织块。加 0.1% 胶原酶, 37 °C 水浴消化 120 min, 吹打成细胞悬液。过 100~200 目尼龙纱网, 细胞悬液经离心 (1 000 r/min, 10 min) 弃上清洗液 3 遍。细胞计数后接种于 96 孔培养板中, 置培养箱, 5% CO₂, 95% 空气, 饱和湿度, 37 °C 孵育。

2.2 半数效应量 (ED₅₀) 测定: 将制备的 VSMC 悬液接种在 96 孔培养板中, 每孔接种培养液 100 μL, 含 2×10⁴ 细胞。实验分对照组和实验组, 对照组加入不含提取物的培养液 20 μL, 实验组加入含各提取物的培养液 20 μL。使各提取物在培养液中的终浓度分别为 666.6, 333.3, 166.6, 83.3, 41.6, 20.8 μg/mL。置含 5% CO₂ 培养箱, 37 °C 孵育 24 h。终止培养前 4 h 加入 MTT, 按下述方法测定各孔吸光度 (A), 计算细胞增殖抑制率。以 Logit 法计算各提取物对细胞增殖抑制的 ED₅₀ 及检验两两 ED₅₀ 值之间差异的显著性。

细胞增殖抑制率 = (1 - A_{实验}/A_{对照}) × 100%

2.3 细胞增殖测定: 将制备的 VSMC 悬液接种在 96 孔培养板中, 每孔接种培养液 100 μL, 含 1×10⁴ 细胞。经 CO₂ 培养箱孵育 48 h, 观察细胞生长状态良好, 加入不同剂量的药物。实验分对照组和实验

组, 对照组加入培养液 20 μL, 实验组加入含提取物的培养液 20 μL。根据增殖抑制实验结果, 细胞增殖测定的剂量为 25, 5, 1 μg/mL。Phe 和 NA 的剂量为 100, 10, 1 μg/mL。继续孵育 24 h 终止培养, 进行 MTT 测定和 BrdU-ELISA 检测。

2.4 BrdU-ELISA 法检测: 每孔加入 BrdU 10 μL 标记细胞, 37 °C 孵育 2 h, 弃培养液。经 60 °C 干燥 1 h, FixDenat 固定液室温固定 30 min。弃固定液加入 Anti-BrdU-POD 液室温放置 90 min, 吸弃抗体加洗涤工作液洗涤, 每孔 3 次。加底物溶液 100 μL, 室温放置 30 min。每孔加 25 μL 终止反应液 (1 mol/L H₂SO₄), 5 min 内自动酶标光度计测量, λ (测) = 450 nm, λ (参) = 690 nm。

2.5 MTT 测定: 每孔加入 1 mg/mL MTT 20 μL, 孵育 4 h, 终止反应。吸弃每孔培养液, 加二甲基亚砷 100 μL, 微量振荡器振荡 5 min, 自动酶标光度计测定各孔 A 值, λ (测) = 550 nm, λ (参) = 620 nm。

2.6 统计: 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间进行 t 检验。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制的 ED₅₀ 测定: 表 1 结果显示, 剂量在 20.8 μg/mL 时, 除 AE 组外, 其他各组的细胞增殖均未受到抑制。表 2 结果显示各提取物的 ED₅₀ 值, 除 EST 组与 AE 组 ED₅₀ 值之间差异显著外, 其他各组 ED₅₀ 值之间差异不显著。

3.2 VSMC 增殖的 MTT 测定: 表 3 结果显示,

表 1 EST 及组方药提取物对 VSMC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

Table 1 Effects of EST and extract from its component drugs on VSMC proliferation ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

提取物	剂量 (μg·mL ⁻¹)	抑制率 /%	提取物	剂量 (μg·mL ⁻¹)	抑制率 /%
EST	666.6	90.43±1.62	AE	666.6	95.49±1.70
	333.3	65.06±2.84		333.3	90.39±1.39
	166.6	35.07±4.27		166.6	65.09±3.87
	83.3	13.28±1.20		83.3	37.36±3.22
	41.4	3.57±2.99		41.4	21.97±7.38
	20.8	0.00±0.00		20.8	4.52±0.98
LE	666.6	88.29±0.28	LAE	666.6	88.68±2.93
	333.3	71.64±1.08		333.3	70.71±2.76
	166.6	36.07±1.10		166.6	37.87±5.35
	83.3	17.15±5.78		83.3	24.26±7.54
	41.4	8.79±7.06		41.4	10.50±3.59
	20.8	0.00±0.00		20.8	0.00±0.00
GE	666.6	95.78±0.54	AGE	666.6	97.34±0.83
	333.3	90.43±1.52		333.3	90.38±1.65
	166.6	71.29±4.93		166.6	88.68±1.50
	83.3	33.64±5.86		83.3	41.32±5.81
	41.4	9.93±5.83		41.4	9.47±4.10
	20.8	0.00±0.00		20.8	0.00±0.00

表 2 EST 及组方药提取物对 VSMC 增殖抑制的 ED₅₀Table 2 ED₅₀ of EST and extract from its component drugs on inhibition of VSMC proliferation

提取物	ED ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	提取物	ED ₅₀ /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
EST	238.44	A E	106.45*
L E	225.24	L A E	217.50
G E	160.42	A G E	143.69

与 EST 组比较: * $P < 0.05$ * $P < 0.05$ vs EST group

MTT 法测定 NA 对 VSMC 的四唑盐还原反应是刺激作用, 而 Phe 对 VSMC 的四唑盐还原反应影响不明显。各提取物对 VSMC 的四唑盐还原反应均有刺激作用。而且, 随着药物剂量的降低, 刺激作用下降。其中 EST, ALE 的作用较强 ($P < 0.001$)。

表 3 MTT 法测定 EST 及组方药提取物对 VSMC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)Table 3 Effects of EST and extract from its component drugs on proliferation of VSMC by MTT assay ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	剂 量 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	A _{550 nm}	组别	剂 量 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	A _{550 nm}
对照	-	0.070 $\pm$ 0.012	GE	25.0	0.136 $\pm$ 0.007**
NA	10.0	0.103 $\pm$ 0.002*		5.0	0.110 $\pm$ 0.007*
	1.0	0.089 $\pm$ 0.002		1.0	0.109 $\pm$ 0.005*
Phe	10.0	0.088 $\pm$ 0.007	A E	25.0	0.130 $\pm$ 0.007**
	1.0	0.086 $\pm$ 0.003		5.0	0.109 $\pm$ 0.003*
EST	25.0	0.148 $\pm$ 0.002***		1.0	0.105 $\pm$ 0.006*
	5.0	0.105 $\pm$ 0.008*	L A E	25.0	0.149 $\pm$ 0.006***
	1.0	0.103 $\pm$ 0.005*		5.0	0.117 $\pm$ 0.008*
L E	25.0	0.137 $\pm$ 0.012**		1.0	0.106 $\pm$ 0.004*
	5.0	0.114 $\pm$ 0.002*	A G E	25.0	0.128 $\pm$ 0.009*
	1.0	0.105 $\pm$ 0.006*		5.0	0.114 $\pm$ 0.009*
				1.0	0.096 $\pm$ 0.002

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

3.3 VSMC 增殖的 BrdU-ELISA 测定: 表 4 结果显示, NA 和 Phe 对 VSMC 的 BrdU 掺入 DNA 均有显著影响, 其中 NA 影响最显著 ($P < 0.001$)。EST 各剂量组对 VSMC 的 DNA 掺入均无显著影响, 但单味药及组合药提取物对 VSMC 的 DNA 掺入均有显著影响, 且随着剂量的降低 DNA 掺入增加。

4 讨论

5 溴-2 脱氧尿苷 (BrdU) 为脱氧胸苷的类似物, 在细胞增殖过程中, 能够掺入到新合成的 DNA 中。BrdU-ELISA 法测定结果可以反应细胞增殖时 DNA 掺入的水平。MTT 测定的原理是细胞中的线粒体脱氢酶将四唑盐还原成不溶性甲臍 (formazan) 沉淀, 主要反应细胞能量代谢的水平。细胞的增殖通常也伴随着细胞代谢的增强, 但是,

表 4 BrdU-ELISA 法测定 EST 及组方药提取物对 VSMC 的 DNA 掺入的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)Table 4 Effects of EST and extract from its component drugs on incorporation in DNA of VSMC by BrdU-ELISA ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	剂 量 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	A _{450 nm}	组别	剂 量 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	A _{450 nm}
对照	-	0.348 $\pm$ 0.059	GE	25.0	0.240 $\pm$ 0.005
NA	100.0	0.327 $\pm$ 0.044		5.0	0.362 $\pm$ 0.012
	10.0	1.548 $\pm$ 0.028***		1.0	0.542 $\pm$ 0.039**
Phe	100.0	0.411 $\pm$ 0.087	A E	25.0	0.345 $\pm$ 0.031
	10.0	0.690 $\pm$ 0.056**		5.0	0.521 $\pm$ 0.066*
EST	25.0	0.247 $\pm$ 0.022		1.0	0.676 $\pm$ 0.074**
	5.0	0.350 $\pm$ 0.032	L A E	25.0	0.486 $\pm$ 0.057*
	1.0	0.391 $\pm$ 0.073		5.0	0.618 $\pm$ 0.031**
L E	25.0	0.425 $\pm$ 0.066		1.0	0.748 $\pm$ 0.063**
	5.0	0.488 $\pm$ 0.064*	A G E	25.0	0.220 $\pm$ 0.021
	1.0	0.550 $\pm$ 0.109*		5.0	0.495 $\pm$ 0.038*
				1.0	0.643 $\pm$ 0.006**

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

DNA 的掺入水平增加和细胞的代谢增强是两个不同的概念。多数情况下, 细胞增殖伴随 DNA 合成增加; 但某些特殊情况下, DNA 合成的增加有时是细胞凋亡的先兆^[5]。

NA 是肾上腺素能神经末梢释放的神经递质, 有强烈的收缩血管作用。NA 可以诱导磷脂酶 D 的活性和 VSMC 的增殖^[6]。而且, NA 可以增加平滑肌细胞的胞质内钙浓度^[7], 这也许是 NA 收缩血管的作用机制之一。Phe 是一种 α -肾上腺素受体阻滞剂, 有扩血管功能。本实验 MTT 测定结果表明, NA 有刺激 VSMC 四唑盐还原反应的作用, 而 Phe 的影响则不明显。结果提示, 血管扩张药和血管收缩药对 VSMC 增殖作用不同。但 BrdU-ELISA 测定的结果表明, NA 和 Phe 对 VSMC 的 DNA 的掺入均有刺激作用。提示细胞的代谢活性与 DNA 合成并非总是呈平行关系。

结果表明 SNT、单味药和组合药的提取物均有促进 VSMC 代谢活性的作用, 其中 EST, LAE 的作用较强。提示 SNT、单味药和组合药提取物可能均有刺激平滑肌收缩的作用。但四逆汤的作用与受体、细胞内钙浓度等影响平滑肌细胞收缩的因素有何关系, 尚待探讨。SNT 对于血管的影响是多方面的。在本实验中, SNT 增强了 VSMC 能量代谢, 可能有刺激平滑肌收缩作用。然而, SNT 还可在低氧条件下刺激血管内皮细胞释放前列环素 (PGI₂)^[8]。而且, 对内毒素性休克大鼠血浆中血管紧张素 II、肿瘤坏死因子、内皮素、PGI₂ 的含量均有显著影响 (待

发表)。值得注意的是,单味药和组合药提取物有刺激 DNA 掺入的作用,但 SNT 提取物却没有此作用。提示组方后药物成分的化学性质可能发生了变化,这种变化尚需深入探讨。

本实验 BrdU-ELISA 法测定结果提示, SNT 并不提高 VSMC 的 DNA 掺入水平,而单味药和组合药提取物及 NA, Phe 均可以提高 VSMC 的 DNA 掺入水平。结果提示, SNT 组方后可能是通过促进 VSMC 代谢活性,起到刺激平滑肌收缩的作用。而组方前的单味药和组合药刺激 VSMC 的 DNA 合成也许是一种副作用。同时,对 VSMC 增殖抑制的 ED_{50} 也反映了组方后 SNT 的毒性下降。本实验进一步表明, SNT 组方用药与单味药及组合药的药理作用不尽相同,这可能是组方用药“减毒增效”的作用机制之一。

References:

- [1] Li P, Huang Q F, Li A F, *et al* Effects of Xinmailing (XML) on pulmonary microvascular permeability and lipo- peroxides in endotoxemia rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中 国病理生理杂志), 1995, 11(3): 226-229.
- [2] Sun H L, Wu W K. Studies on protective effect of SNI TANG comprising active components combined at different dosage on myocardial ischemia reperfusion injury in mice [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(4): 333-336.
- [3] Wu W K, Su J W, Lin S G, *et al* Clinical study on effect of SNI Decoction on ischemia/reperfusion injury by Holter monitoring in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 2001, 21(10): 744-746.
- [4] Tan H M, Wu W K, Luo H C, *et al* Effect of Sini Decoc- tion on GST expression in the ischemic myocardium [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2002, 18(4): 413-414.
- [5] Hong H S, Chen F R, Zhu Y B, *et al* A ssay of proliferation and metabolic of vascular smooth muscle cells [J]. *Chin J Cell Biol* (细胞生物学杂志), 2001, 23(1): 36-39.
- [6] Pamentier J H, Smelcer P, Pavicevic Z, *et al* PKC-zeta mediates norepinephrine-induced phospholipase D activation and cell proliferation in VSMC [J]. *Hypertension*, 2003, 41 (3 Pt 2): 794-800.
- [7] Sato M, Kawatani M. Effects of noradrenaline on cytosolic concentrations of Ca^{2+} in cultured corpus cavernosum smooth muscle cells of the rabbit [J]. *Neurosci Lett*, 2002, 324(2): 89-92.
- [8] Liu P, Ge Y C, Li C Y, *et al* Effect of extracts from Decoc- tion for Resuscitation and its component drugs on prostacy- clin release from at vascular endothelial cells under acute hy- poxia [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (Suppl): 126-128.

不同产地冬虫夏草清除羟自由基作用的研究

蔡仲军, 陈仕江, 尹定华, 张 艳*

(重庆市中药研究院, 重庆 400065)

摘 要:目的 比较不同产地冬虫夏草对羟自由基的清除作用。方法 采用邻二氮菲- Fe^{2+} 氧化法检测不同产地冬虫夏草水提液对 H_2O_2/Fe^{2+} 体系产生的羟自由基的清除作用。结果 来自西藏那曲地区、云南滇西北地区 and 四川川西北地区的冬虫夏草均对 Fenton 反应产生的羟自由基有显著或极显著的清除作用, 且来自不同微生态环境的样品之间的清除作用差异比来自不同主产区样品之间的清除作用差异更明显。结论 冬虫夏草水提液有明显地清除羟自由基的作用, 且微生态环境对该作用有较大的影响。

关键词: 冬虫夏草; 羟自由基; 微生态环境; 相互变异率

中图分类号: R 285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2004)01-0057-03

Scavenging effect of Cordyceps growing in different environment on hydroxyl radical

CA I Zhong-jun, CHEN Shi-jiang, YN Ding-hua, ZHANG Yan

(Chongqing Institute of Chinese Materia Medica, Chongqing 400065, China)

Abstract: **Object** To investigate and compare the scavenging effect of *Cordyceps* growing in different environment on hydroxyl radical. **Methods** 10-Phenanthroline- Fe^{2+} oxidative assay was used to observe the effect of scavenging hydroxyl radical from H_2O_2/Fe^{2+} system by the aqueous extracts of *Cordyceps*. **Results** *Cordyceps* from Naqu of Xizang, northwest Yunnan, and northwest Sichuan all showed us the significant effect on scavenging of hydroxyl radical produced from Fenton Reaction. The biggest values of MDR among *Cordyceps* specimens from various microecological environment surpassed that among specimens of Naqu of Xizang, northwest Yunnan, and northwest of Sichuan. **Conclusion** The aqueous extracts of *Cordyceps* could scavenge the hydroxyl radical from Fenton Reaction. The microecological envi-

* 收稿日期: 2003-05-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30240067)

作者简介: 蔡仲军(1957—), 男, 重庆市人, 硕士, 助理研究员, 从事中药研究及开发工作。