

• 药理与临床 •

补阳还五汤对血瘀证大鼠血管内皮细胞黏附分子表达的影响

陈利国, 屈 援, 葛红颖*, 胡小勤*, 聂优爱*, 何孟栖*

(暨南大学, 广东 广州 510632)

摘要:目的 研究补阳还五汤对血瘀证大鼠血管内皮细胞黏附分子表达的影响。方法 采用免疫组织化学和 RT-PCR 方法观察补阳还五汤不同剂量对血瘀证大鼠血管内皮细胞细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)、血小板-内皮细胞黏附分子-1 (PECAM-1) 和诱生型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达的影响。结果 模型组 ICAM-1、VCAM-1、PECAM-1、iNOS 高表达, 补阳还五汤能减少造模动物 ICAM-1、VCAM-1、PECAM-1、iNOS 的表达, 而且随着药物剂量的减少, 各分子表达呈递增趋势, 具有明显的量效关系。结论 补阳还五汤能显著降低血瘀证大鼠血管内皮细胞黏附分子高表达, 且量效关系明显。

关键词:血瘀证; 血管内皮细胞; 补阳还五汤; 黏附分子; 免疫组织化学法; RT-PCR

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)05-0706-04

Effect of Buyang Huanwu Decoction on expression of adhesion molecules in vascular endothelial cells of blood stasis rats

CHEN Li-guo, QU Yuan, GE Hong-ying, HU Xiao-qin, NIE You-ai, HE Meng-qi

(Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of Buyang Huanwu Decoction (BHD) on adhesion molecules in vascular endothelial cells (VECs) of blood stasis rats. **Methods** Expression of ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, iNOS in vascular endothelial cells of blood stasis rats receiving different doses of BHD was observed by immunohistochemical method and RT-PCR. **Results** The expression of ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, iNOS was increased in model group, while was decreased by BHD. There was an increase tendency on the expression of molecules and significant dose-effect relationship along with the decrease of the BHD doses. **Conclusion** The increased expression of adhesion molecules in vascular endothelial cells of blood stasis rats could be reduced by BHD in a dose dependent manner.

Key words: blood-stasis; vascular endothelial cells (VECs); Buyang Huanwu Decoction (BHD); adhesion molecules; immunohistochemical method; RT-PCR

补阳还五汤一方,出自《医林改错》,王清任谓:“此方治半身不遂,口眼歪斜,语言謇涩,口角流涎,大便干燥,小便频数,遗尿不禁”。本方的特点是重用补气药黄芪,是一首具有补气活血功能,用于气虚血瘀各种病证的有效方剂,也是补气活血的代表方,广泛用于临床各科疾病。近年来,对本方的药理、药效、毒理等方面开展了大量的实验研究,但尚未见本方对血管内皮细胞黏附分子表达影响的研究报道。本实验运用免疫组织化学和 RT-PCR 方法,观察补阳还五汤不同剂量对血瘀证模型大鼠血管内皮细胞几种黏附分子:细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1)、血小板-内皮细胞黏附

分子-1 (PECAM-1) 以及诱生型一氧化氮合酶 (iNOS) 表达的影响。

1 材料

1.1 动物:SD 大鼠,由第一军医大学实验动物中心提供。

1.2 试剂:抗体购自美国 Santa Cruz 公司。酸性酚购自北京鼎国生物技术有限责任公司;One-Step RT-PCR Kit 购自 QIAGEN 公司;异硫氰酸胍、DEPC、月桂肌酸钠购自上海生工生物技术服务有限公司;柠檬酸钠、氯仿、异丙醇均购自汕头市光华化学厂;琼脂糖、Marker 购自大连宝生物工程公司;β-巯基乙醇、Tris、矿物油、SDS 均购自 Sigma 化学

收稿日期:2004-10-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30070909);广东省“千百十工程”优秀人才培养基金资助项目(Q0262)

作者简介:陈利国(1960—),男,山东省博兴县人,教授,博士生导师,暨南大学医学院副院长、中医系主任,主要研究血瘀证的形成机制及中医学概念范畴体系。Tel: (020) 85226467 E-mail: tchenly@jnu.edu.cn

* 暨南大学医学院 2001 级硕士研究生

试剂公司。

1.3 中药复方组成:黄芪 30 g,赤芍 4.5 g,川芎 3 g,当归 6 g,地龙 3 g,桃仁 3 g,红花 3 g (此为成人 1 d 的用量)。药材购自广州同仁堂大药店。水煎至含生药 2 g/mL。

1.4 主要仪器:PE480 热循环仪,高速冷冻离心机 (Sorvall RC5C Plus),凝胶图像分析仪 (Syngene),UV-1601 型紫外分光光度仪 (Shimadzu),医用净化工作台 (苏州净化设备厂),ZF 型紫外分析仪 (上海嘉鹏科技有限公司),恒压恒流 DF-D 型电泳仪 (北京东方特力科贸中心)。

2 方法

2.1 动物分组、造模:SD 大鼠 30 只,体重 210~230 g,雌雄各半,随机分为对照组、模型组、补阳还五汤高、中、低剂量组,每组 6 只。参照文献方法造模^[1]。将 1 mg/mL 盐酸肾上腺素用生理盐水稀释 1 倍,第 1 天每隔 4 h sc 0.2 mL 稀释后的盐酸肾上腺素,共给药 3 次,在每次给药的中间时间将大鼠放入 0~2 ℃ 冰水中 4 min 进行两次冷刺激;第 2 天仍按前日剂量 sc 两次 (间隔 4 h),在两次给药的中间时间将大鼠放入冰水中 3 min 进行 1 次冷刺激。

2.2 免疫组织化学方法

2.2.1 给药方法:于造模第 3 天动物禁食 12 h 后以成人剂量 (成人按 60 kg 计算) 的 20、10、5 倍 ig 给予补阳还五汤,每天给药 1 次,连续 3 d。

2.2.2 标本采集及处理:于造模第 6 天,3% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,无菌取主动脉一段,4% 甲醛固定。切片:APES (北京中山公司) 硅化载玻片,使用德国 Leica 公司的组织切片机切片,使用硅化好载玻片捞片,放置切片盒待用。染色:ICAM-1、PECAM-1、iNOS (家兔) 采用 Envision 二步法,VCAM-1 (山羊) 采用 ABC 法。

2.2.3 图像采集及测定:在光学显微镜下,选取切片 (每只动物分别取 2 张) 中适合测量的视野,然后采用 Leica 显微摄像系统 (德国) 所带的 Qwin500,使用刻度为 5 的光强度,在 40×10 的放大倍数,按照 0、45、90、135、180、225、270、315 的角度,分别采集灰度图像 (像素大小:512×512,格式:TIFF) 保存。图像测定:使用 Scion image 软件打开采集图片,并对每一图片的 5 个阳性部位测量其灰度值 (一个像素点),同时测量免疫组化背景染色 (大面积),并将测试结果记录下来,即每张切片有 40 个阳性部位测试值和 8 个背景测试值。

2.2.4 数据处理:将所测得数据输入到 Excel 中,

通过公式计算出阳性单位 (PU) 值。

$$PU = \frac{|G\alpha - G\beta|}{G_{\max}} \times 100 = \frac{|G\alpha - G\beta|}{256} \times 100$$

Gα、Gβ 分别为待测结构 α 和背景 β 的平均灰度,G_{max} 为检测仪器的最大灰度

2.3 RT-PCR 方法

2.3.1 药物血清制备:动物按 2.1 项方法分组造模。给药剂量同 2.2.1 项,每天 ig 2 次,连续 3 d。于第 3 天首次给药后 2 h,重复 ig 1 次,第 2 次 ig 后 1 h,2% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,无菌条件下腹主动脉取血,分离血清,2 000 r/min 离心 20 min,取上清液即为含药血清,56 ℃、30 min 灭活,-20 ℃ 冻存,临用前 4 ℃ 融化,按 10% 比例分别于实验前加入培养液中。

2.3.2 细胞分离与收集:无菌条件下分离大鼠主动脉,将血管内膜暴露于外,两端折入结扎。以 0.25% 胶原酶 II 磁力搅拌消化和细胞刮擦法交替进行,每次消化 10 min,共 3 次,将收集的细胞接种在用 3% 的明胶铺板的 Betri 培养皿中,37 ℃、5% CO₂ 培养箱静置培养。于细胞培养第 3 天进行 RT-PCR 检测。内皮细胞鉴定采用第 VIII 因子相关抗原 ABC 法。

2.3.3 引物:均由北京赛百盛基因技术有限公司合成。β-actin:引物 A 序列:5'-TGGAGAAGAGC-TATGAGCTG-3',707 bp;引物 B 序列:5'-GATA-GAGCCACCAATCCACA-3',103 5 bp;ICAM-1:引物 A 序列:5'-AATTCCACTGAATGCCAGC-3',1 127 bp;引物 B 序列:5'-CAGTACCAACA-CACCAACAA-3',1 539 bp;PECAM-1:引物 A 序列:5'-GGTCAACAGAAGCAATCTGG-3',300 bp;引物 B 序列:5'-GGTGAGAGTGGCAA-TTATCC-3',574 bp;VCAM-1:引物 A 序列:5'-GGTCTACCAGCTCCTGCGAT-3',805 bp;引物 B 序列:5'-GAGAGTCACAGCCAACAGCA-3',1 084 bp;iNOS:引物 A 序列:5'-TGGAGAAGAGC-TATGAGCTG-3',3 635 bp;引物 B 序列:5'-AAG-GAATTATACACGGAAGG-3',4 047 bp。

2.3.4 RT-PCR 反应:参考 QIAGEN 公司试剂盒的方法。反应总体积 25 μL,模板 RNA 0.05 μg,2.5 mmol/L dNTP 混合液 1 μL,5×PCR 缓冲溶液 5 μL,混合酶 1.25 U,引物各 0.25 μL (100 pmol/μL),蒸馏水补至总反应体积 25 μL,30 μL 矿物油覆盖,所有组分的混合均在冰上进行。应用 PE-480 热循环仪进行 PCR 扩增。PCR 热循环参数为 50 ℃ 逆转录 30 min,95 ℃ 灭活转录酶 15 min,进入热循环,94 ℃ 变性 1 min,ICMA-1 和 iNOS 两种引物退

火温度相同,均为 53℃ 退火 1 min (VCAM-1 为 57℃ 退火 1 min; PECAM-1 为 55℃ 退火 1 min), 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min。10 μL PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶染色,100 bp DNA Marker 为相对分子质量标准,电泳结果在紫外灯下观察并用凝胶图像分析仪记录结果。

3 结果

3.1 免疫组织化学方法进行染色后切片的图像测定和数据分析:结果表明,造模动物血管内皮细胞黏

附分子——ICAM-1、VCAM-1、PECAM-1 均较对照组表达增多 ($P<0.05$),其中以 ICAM-1 最明显 ($P<0.01$),而 iNOS 虽有高表达的趋势,但差异不显著。反映血瘀证的形成与血管内皮细胞黏附分子表达有关。结果见表 1。

3.1.1 补阳还五汤对 VCAM-1 表达的影响:高、中、低剂量补阳还五汤均能减少血瘀证大鼠 VCAM-1 的表达 ($P<0.05$),而且与剂量呈正相关,即随着剂量的降低,图像分析数据呈递增趋势,表现出了明显的量效关系。

表 1 补阳还五汤对 ICAM-1、VCAM-1、PECAM-1 和 iNOS 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effect of BHD on expression of ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, and iNOS ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组 别	剂量	ICAM-1	VCAM-1	PECAM-1	iNOS
对照	—	4.247 7±0.193 5	6.270 3±0.767 3	4.118 0±0.665 3	5.300 0±0.339 6
模型	—	6.862 8±0.640 2 $\Delta\Delta$	8.091 2±0.426 6 Δ	5.511 5±0.252 6 Δ	6.203 5±0.418 9
补阳还五汤	高	4.367 3±0.390 5**	5.944 2±0.765 4*	5.161 0±0.604 0	4.238 3±0.454 3**
	中	7.607 2±0.916 4	6.623 0±0.657 3*	5.077 5±0.614 7	4.491 5±0.535 1**
	低	10.811 0±1.790 8*	6.886 7±0.354 5*	4.138 3±0.468 6**	5.427 5±0.547 3

与对照组比较: $\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

$\Delta P<0.05$ $\Delta\Delta P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

3.1.2 补阳还五汤对 ICAM-1 表达的影响:高剂量组表达显著减少 ($P<0.01$),而中、低剂量组表达反而增加,也呈现出随剂量的降低,图像分析数据呈递增趋势,说明对 ICAM-1 表达的影响与剂量有关。

3.1.3 补阳还五汤对 PECAM-1 表达的影响:图像分析数据显示,随着用药剂量的降低,数据呈递减趋势,与剂量呈负相关关系,其结果与 VCAM-1 和 ICAM-1 不同。所形成的量效关系的机制有待于进一步探讨。

3.1.4 补阳还五汤对 iNOS 表达的影响:高、中剂量组明显减少 iNOS 的表达 ($P<0.01$),而且随着剂量的降低,图像分析数据呈递增趋势。结果与对 VCAM-1 和 ICAM-1 影响的量效关系一致。

3.2 RT-PCR 的数据分析:造模动物血管内皮细胞黏附分子——ICAM-1、VCAM-1、PECAM-1、iNOS mRNA 表达均较对照组显著增多 ($P<0.01$)。反映血瘀证的形成与血管内皮细胞黏附分子表达有关,与应用免疫组化方法所得结果一致。结果见表 2。

表 2 补阳还五汤对 ICAM-1、VCAM-1、PECAM-1 和 iNOS mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effect of BHD on mRNA expression of ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, and iNOS ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组 别	剂量	ICAM-1	VCAM-1	PECAM-1	iNOS
对照	—	0.238 1±0.023 9	0.432 6±0.008 9	0.441 7±0.017 8	0.405 3±0.010 4
模型	—	0.840 1±0.030 8 $\Delta\Delta$	0.814 9±0.031 7 $\Delta\Delta$	0.887 5±0.035 1 $\Delta\Delta$	0.864 3±0.029 4 $\Delta\Delta$
补阳还五汤	高	0.525 6±0.029 6**	0.401 5±0.021 6**	0.410 3±0.083 4**	0.281 0±0.052 5**
	中	0.548 7±0.024 1**	0.718 7±0.035 4*	0.538 7±0.051 7**	0.511 1±0.027 5**
	低	0.639 7±0.016 4**	0.862 3±0.039 2	0.584 8±0.071 5**	0.645 6±0.043 1**

与对照组比较: $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

$\Delta\Delta P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group

3.2.1 补阳还五汤对 ICAM-1 mRNA 表达的影响:高、中、低剂量组均能减少血瘀证大鼠 ICAM-1 mRNA 的表达 ($P<0.01$),而且与剂量呈正相关。

3.2.2 补阳还五汤对 VCAM-1 mRNA 表达的影响:高、中剂量组表达减少显著 ($P<0.01, 0.05$),而低剂量组反而增加。

3.2.3 补阳还五汤对 PECAM-1 mRNA、iNOS mRNA 表达的影响:数据分析显示,随着用药剂量

的变化,均出现由高到低的数据递增趋势,量效关系明显。

4 讨论

近年来,随着分子生物学和分子免疫学的发展,黏附分子的研究日益受到关注。实验和临床研究表明,黏附分子具有广泛而重要的生物学功能,目前已基因克隆成功的黏附分子多达几十种,形成了一个庞大的黏附分子家族,主要有:黏合素家族;免疫球

蛋白家族;选择凝集素家族;钙离子依赖的细胞黏附素家族;以及一些未归类的黏附分子:整合素超家族;免疫球蛋白超家族;选择素超家族;钙依赖黏附分子超家族等。黏附分子参与细胞的信号转导与活化,细胞的伸展和移动,细胞的生长及分化、炎症、血栓形成、肿瘤转移、创伤急救等一系列重要生理和病理过程。随着中医、中药研究的进展,已观察到中药对黏附分子表达的影响^[2~4]。

本实验运用免疫组织化学和 RT-PCR 两种方法进行研究的结果表明,补阳还五汤对血瘀证大鼠血管内皮细胞黏附分子蛋白及 mRNA 的表达的影响,除 PECAM-1 的免疫组化结果外,均呈现出了明显的量效关系。

关于补阳还五汤对 iNOS 影响的研究,已有报道^[5~7],但均未进行量效关系的研究。从本实验运用两种方法进行的量效关系的研究结果来看,不同剂量的疗效具有一定差异,从而为临床应用提供了实验依据。

References:

- [1] Xie Y H, Wang S W, Cui H M. The effects of hirudo on normal and experimental hemostasis rats' hemorrhheology [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 1996, 17(2): 101-103.
- [2] Wu Y, Zhu B D. Effect of Danggui Buxue Decoction on proliferation and expression of intercellular adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells [J]. *J West China Univ Med Sci* (华西医科大学学报), 2001, 32(4): 593-595.
- [3] Zhang Y J, Zhao L G, Wu X Z. Effect of Huoxuehuayu Decoction on expression of adhesive molecular of intrapulmonic endothelial cell of rats suffered from SAP [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(11): 1010-1012.
- [4] Hao Y, Qiu Q Y, W J. Effect of astragalus polysaccharin (APS) on lymphocyte-endothelium adhesion and the molecular mechanism [J]. *Immunol J* (免疫学杂志), 2000, 16(3): 206-209.
- [5] Mao X P, Chen X F, Zhang L, et al. Influences of Buyang Huanwu Decoction extract on nitric oxide synthase activity in cerebral ischemic reperfusion damage in rats [J]. *Stroke Nerv Dis* (卒中与神经疾病), 2001, 8(2): 103-104.
- [6] Guo P, Wang J, Wang H. The study of mechanism of Buyang Huanwu Decoction on antagonizing cerebral ischemia reperfusion injury [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2001, 17(2): 3-4.
- [7] Liao C L, Tong L, Shen J G. Effect of Buyang Huanwu Decoction on cerebral nitricoxide synthase level during focal cerebral ischemia in mice [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2003, 19(4): 5-7.

以血清药理学方法研究黄连解毒汤对小鼠的药效动力学

宋 珏,路 通,谢 林,王广基,刘晓东*

(中国药科大学 江苏省药物代谢动力学重点实验室,江苏 南京 210038)

摘要:目的 以含药血清对小鼠肝匀浆体外生成丙二醛(MDA)的抑制作用为指标,研究黄连解毒汤及单味药水煎剂的药效动力学。方法 测定小鼠 ig 黄连解毒汤及单味药所得含药血清对 MDA 生成作用的经时过程,并考察黄连解毒汤含药血清、单味药煎剂及小檗碱、黄芩苷抑制 MDA 生成作用的剂量-效应关系。结果 小鼠 ig 黄连解毒汤、黄连、黄芩、黄连+黄芩后,含药血清均可抑制体外肝匀浆 MDA 生成,且作用呈剂量依赖性。各药的 E_{max} 分别为 86%、76%、79% 及 81%; t_{max} 分别为 180、120.5 及 15 min;其煎剂对 MDA 生成抑制作用呈剂量依赖性;小檗碱在 0.12~10 ng/mL 无明显的抑制作用;黄芩苷在 1.11~10 μ g/mL 有抑制作用,且作用亦呈剂量依赖性。结论 黄连解毒汤体内抗氧化作用强于各单方。黄芩苷可能是黄芩药液和含药血清中的抗氧化成分之一,而小檗碱可能与含药血清抗氧化作用无关;小鼠 ig 黄连解毒汤及其单味药所得含药血清对 MDA 生成呈时间和剂量依赖性。

关键词:黄连解毒汤;丙二醛(MDA);血清药理学;药效动力学

中图分类号:R285.61

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)05-0709-05

Pharmacodynamic study on Huanglian Jiedu Decoction in mice by serum pharmacological method

SONG Jue, LU Tong, XIE Lin, WANG Guang-ji, LIU Xiao-dong

(Jiangsu Key Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics,

China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Abstract: Objective To study the pharmacodynamic characteristics of Huanglian Jiedu Decoction

收稿日期:2004-10-10

基金项目:国家中医药管理局基金资助项目(02-032P32);国家“863”项目资助(2003AA2Z347A)

作者简介:宋 珏(1979—),女,安徽芜湖人,中国药科大学药理学在读硕士研究生,主要从事药理学研究。

* 通讯作者 E-mail: XDliu@hotmail.com Tel: 02583271006