

血府逐瘀汤对缺氧条件下肺动脉平滑肌细胞增殖 及培养液中 NO 水平的影响

徐 粟¹, 丁志山², 楼兰花², 高承贤², 宋 红^{2*}

(1. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

摘 要:目的 研究血府逐瘀汤(XFZYD)对缺氧条件下肺动脉平滑肌细胞(PASMC)增殖及培养液中 NO 水平的影响。方法 通过建立新生牛 PASMC 的原代和传代培养及缺氧细胞增殖模型, 采用 MTT 法、光镜计数观察缺氧对 PASMC 增殖的影响; Griss 试剂法测定 PASMC 培养液中 NO 的量。结果 血府逐瘀汤能显著抑制缺氧条件下 PASMC 增殖, 高、中、低剂量组与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$); 血府逐瘀汤能显著提高缺氧条件下 PASMC 培养液中 NO 的量 ($P < 0.05$)。结论 血府逐瘀汤能抑制缺氧条件下 PASMC 增殖; 提高 NO 水平可能是血府逐瘀汤抑制缺氧条件下 PASMC 增殖作用的途径之一。

关键词:血府逐瘀汤; 肺动脉平滑肌细胞(PASMC); 活血化痰

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2007)09-1379-03

Effect of Xuefuzhuyu Decoction on pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and NO level in PASMC culture medium under hypoxia

XU Su¹, DING Zhi-shan², LOU Lan-hua², GAO Cheng-xian², SONG Hong²

(1. The Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China;

2. Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053, China)

Key words: Xuefuzhuyu Decoction; pulmonary arterial smooth muscle cell (PASMC); promoting blood circulation and removing blood stasis

在肺心病的病理演变过程中, 肺动脉高压(hypoxemic pulmonary hypertension, HPH)是其形成的标志, 成为其进一步加重的病理基础。缺氧是引起 HPH 的主要原因之一。HPH 形成目前认为包括低氧性肺血管收缩和肺血管结构重构两个方面。而肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cell, PASMC)的异常增生是这种血管重构的重要基础。NO 是一种重要的细胞内信使物质和发现的第一个气体型递质, 同时又是效应分子, 具有拮抗 HPH 形成的作用。血府逐瘀汤(Xuefuzhuyu Decoction, XFZYD)是治疗心肺疾患的经典方剂, 研究显示可抑制 PASMC 增殖^[1], 本实验通过观察血府逐瘀汤对缺氧条件下 PASMC 培养液中 NO 水平的影响, 来进一步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 血府逐瘀汤组成药物: 当归 90 g、生地 90 g、桃仁 120 g、红花 90 g、枳壳 60 g、赤芍 60 g、柴胡 30 g、桔梗 50 g、川芎 50 g、牛膝 90 g、甘草 30 g, 均

购自浙江中医学院门诊部中药部, 符合 2005 年版《中国药典》。

1.2 试剂: 1:250 胰蛋白酶(进口分装, 吉泰科技有限公司), 超级新生牛血清(杭州四季青生物工程有限公司), RPMI-1640 培养基(美国 Life Technologies 公司), 噻唑蓝(MTT, 上海华美生物工程公司), 二甲基亚砷(分析纯, 江苏鸿声化工厂), D-Hanks 平衡盐溶液, Folin(甲、乙)试剂、Griss 试剂(自制)。

1.3 仪器: 三气细胞培养箱 CO₂ 细胞培养箱, 德国 Heraeus 公司、XDS-1 相差显微镜系统, 重庆光学仪器厂、UV-754 型紫外可见分光光度计, 上海第三分析仪器厂、UR-4100 型酶标仪, 美国 Dynatech 公司。

1.4 新生牛 PASMC 的原代和传代培养: 无菌取出新生牛肺 1~2 级动脉(取自杭州四季青生物工程有限公司), D-Hanks 液清洗后, 剪开血管, 刮去血管内皮, 剥离并将中膜肌层切成小块, 贴块法接

收稿日期: 2007-02-20

基金项目: 浙江省中医药管理局青年基金资助课题(491020-W50325)

作者简介: 徐 粟(1970-), 男, 山东淄博人, 主治医师, 硕士, 主要研究方向为呼吸系统疾病慢性阻塞性肺病, 抗细菌耐药性研究等。

Tel: (0571) 87783511 E-mail: XSHZXS@163.com

* 通讯作者 宋 红 Tel: (0571) 86613611 E-mail: honsong@163.com

种于培养瓶中,待贴壁后加入含10%小牛血清的RPMI-1640培养液,置于培养箱内培养10d左右,待80%融合时,以0.1%胰酶消化传代培养,实验用4~6代细胞。

2 方法

2.1 血府逐瘀汤制备:取组方药材加重蒸水200 mL浸泡30 min后,直火煎沸30 min,收集煎煮液,药渣加重蒸水1 500 mL,同煎沸20 min,合并两次滤液,4 000 r/min离心15 min后取上清液,浓缩至含生药1 g/mL。分装灭菌,备用。

2.2 缺氧条件下PASC增殖的影响:将4~6代PASC以 1×10^4 /mL,200 μ L/孔接种培养于96孔板,置CO₂培养箱24 h后,换不含小牛血清RPMI-1640培养液静止同步培养24 h,实验分为以下两组:缺氧组(置三气培养箱,充95% N₂-5% CO₂混合气)、常氧对照组(置CO₂培养箱21% O₂),每孔12孔。培养48 h后,加入MTT溶液(5 mg/mL)20 μ L/孔,继续孵育5 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,加入二甲亚砜150 μ L/孔,振荡10 min后,酶标仪波长630 nm处测吸光度(A)值。

2.3 血府逐瘀汤对缺氧条件下PASC增殖的影响

2.3.1 光镜计数:将4~6代PASC以 3×10^5 /瓶培养于20 mL培养瓶中,培养24 h,换不含小牛血清的RPMI-1640培养液静止同步培养24 h,将60瓶PASC分为4组:血府逐瘀汤高、中、低剂量(分别相当于含血府逐瘀汤生药0.5、0.25、0.125 g/mL)组,对照组(不含小牛血清RPMI-1640培养液),每组10瓶。血府逐瘀汤组及对照组加药60 μ L/瓶。缺氧条件下培养48 h后,消化分散,光镜下计数比较各组细胞。

2.3.2 MTT法:分组同2.3.1项,每组12孔,加药10 μ L/孔。方法同2.2项。

2.4 血府逐瘀汤对PASC表达NO的影响:将4~6代PASC以 3×10^5 /瓶培养于20 mL培养瓶中,培养24 h后,换不含小牛血清RPMI-1640培养液静止同步培养24 h,分为5组:血府逐瘀汤高、中、低剂量(分别相当于含血府逐瘀汤生药0.5、0.25、0.125 g/mL)组,缺氧对照组(加不含小牛血清RPMI-1640培养液)及常氧对照组(21% O₂),每组12瓶,各加药60 μ L/瓶。常氧对照组充21% O₂,其余各组充95% N₂-5% CO₂混合气培养。48 h后,以UV-754分光光度计于波长545 nm处测培养上清液A值,换算成NO水平。

2.5 数据处理:数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用统计软件包

SPSS12.0进行t检验。

3 结果

3.1 缺氧对PASC增殖的影响:镜下观察,缺氧组与常氧对照组细胞生长状态无明显差别。MTT法结果缺氧组A值(0.121 ± 0.008)与常氧组A值(0.108 ± 0.009)比较有显著差别($P < 0.05$),提示缺氧有促PASC增殖作用。

3.2 血府逐瘀汤对缺氧条件下PASC增殖的影响:血府逐瘀汤组PASC明显被抑制,血府逐瘀汤高、中、低剂量组与对照组比较差异显著($P < 0.05$)。结果见表1。

表1 血府逐瘀汤对缺氧条件下PASC增殖的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of XFZYD on proliferation of PASC under hypoxia condition ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(g·mL ⁻¹)	细胞数/($\times 10^4$ ·mL ⁻¹)	A值($n=12$)
血府逐瘀汤	0.5	$1.50 \pm 0.05^{**}$	$0.129 \pm 0.007^*$
	0.25	$3.00 \pm 1.00^{**}$	$0.140 \pm 0.007^*$
	0.125	$6.00 \pm 0.87^*$	$0.151 \pm 0.002^*$
对照	—	8.00 ± 1.73	$0.161 \pm 0.010^*$

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.3 血府逐瘀汤对缺氧条件下PASC分泌NO的影响:表2结果表明,缺氧条件下PASC可表达NO;血府逐瘀汤高、中、低剂量组均可提高PASC培养液中NO水平,与缺氧对照组比较差异显著($P < 0.05$),而常氧条件下则未能发现NO。

表2 血府逐瘀汤对缺氧条件下PASC NO的表达影响
($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

Table 2 Effect of XFZYD on NO expression of PASC under hypoxia condition ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	剂量/(g·mL ⁻¹)	A值	NO/(nmol·L ⁻¹)
血府逐瘀汤	0.5	0.115 ± 0.003	$5.75 \pm 0.15^*$
	0.25	0.080 ± 0.001	$4.00 \pm 0.05^*$
	0.125	0.053 ± 0.005	$2.65 \pm 0.25^*$
缺氧对照	—	0.020 ± 0.003	1.00 ± 0.15
常氧对照	—	—	—

与缺氧对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs hypoxia control group

4 讨论

血府逐瘀汤是王清任所创的活血化瘀经典方剂,由桃红四物汤和四逆散加桔梗、牛膝组合而成,桃红四物汤活血化瘀,四逆散疏肝理气。血府逐瘀汤作为治疗血府血瘀的代表方剂对肺心病具有良好的治疗作用,这已被大量临床研究证明。既往研究证实其具提高小鼠耐缺氧能力的作用。血管重构是一个慢性发生发展的过程,祖国医学认为“久病必瘀”、

“久病人络”，王清任《医林改错》说“入络为瘀”，缺氧促进 PASMC 增殖，而致肺动脉血管重构，正是这一理论的体现。研究表明，血府逐瘀汤可明显抑制缺氧对 PASMC 增殖的促进作用，并且随药物浓度的增加，呈剂量依赖性作用。

在病理状态时，HPH 患者的肺动脉内皮有严重的组织学异常，其内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 基因很少表达甚至不表达，eNOS 的酶活性与组织学病变严重程度呈显著负相关关系^[2]。而诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 被认为是在受到缺氧、细胞因子等刺激后呈诱导性表达，是 Ca^{2+} /CaM 非依赖性的，可能起到介导免疫和细胞毒性的作用。缺氧可诱导大鼠 PASMC 中的 iNOS 基因和蛋白的表达，使 PASMC 具有 NOS 活性，而发挥 NO 调节作用^[3]。本实验结果与以往报道一致，在无内皮细胞及其他因素时，常氧条件下 PASMC 培养液无 NO 测出，而缺氧条件下则有 NO 测出，表明在缺氧条件下，PASMC 具有自分泌 NO 的能力。研究发现内源及外源性 NO 都有抑制 PASMC 增殖的作用^[4]。作用机制一方面可能是 NO 在血管平滑肌细胞内，与细胞浆可溶性鸟苷环化酶血红素部分结合，激活鸟苷

环化酶，后者再催化三磷酸鸟苷变成 cGMP，增加细胞内的 cGMP 浓度，使 NO 活性区局部血管扩张，组织血流增加，从而使局部缺氧得到改善，cGMP 被磷酸二酯酶水解而失活。另一方面可能是其细胞毒作用。

血府逐瘀汤能明显增加体外培养的 PASM 培养液中的 NO 浓度，可能是提高了 PASMC 的自分泌 NO 的水平，从而抑制 PASMC 增殖。

致谢：沃兴德教授对本研究的指导帮助。

References:

- [1] Song H, Xu S. Effect of Xuefuzhuyu Decoction on the pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation [J]. *J Zhejiang Coll Tradit Chin Med* (浙江中医学院学报), 2002, 26(2): 67-68.
- [2] Du J B, Zhao B, Li W, et al. Nitric oxide synthase mRNA expression in pulmonary arteries of hypoxic pulmonary hypertensive rats [J]. *Chin J Pediatr* (中华儿科杂志), 1998, 36(1): 19.
- [3] Wang P Y, Liu J, Luo D C, et al. The function of nitrogen monoxide in pulmonary arterial smooth cell under hypoxia [J]. *Chin Pharmacol Bull* (中国药理学通报), 1997, 13(5): 47.
- [4] Zeng Q, Ran P X, Chen S C, et al. The inhibitory mechanism of nitric-oxide synthase gene transfection on hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Chin J Tuberc Respir Dis* (中华结核和呼吸杂志), 2003, 26(6): 358-361.

红花提取物对犬急性心肌缺血的保护作用

李路江¹, 吴子芳², 吕文伟³, 陈霞^{3*}

- (1. 吉林大学第一医院 器官移植中心, 吉林 长春 130021; 2. 吉林石油集团公司总医院, 吉林 松原 138000
3. 吉林大学白求恩医学院 药理学教研室, 吉林 长春 130021)

红花系菊科红花属植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花，性温味辛，能活血通经、散瘀止痛。研究表明，红花提取物能抑制血小板聚集，抑制血栓形成，延长凝血时间^[1]，对结扎冠状动脉所致的大鼠急性心肌缺血有保护作用^[2]。为全面研究红花提取物抗心肌缺血作用，本实验采用结扎犬左冠状动脉前降支造成的心肌缺血模型，探讨红花提取物对犬急性心肌缺血的保护作用。

1 材料与方法

1.1 药品：红花提取物由吉林省中医中药研究院提供（含红花黄素 81.37%）。地奥心血康胶囊由成都地奥制药集团有限公司生产，批号 0312066。氯化硝

基四氮唑蓝 (NBT)，上海惠世生化试剂有限公司生产，批号 20040708。磷酸肌酸激酶 (CPK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、游离脂肪酸 (FFA)、过氧化脂质 (LPO)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 测定试剂盒由中生北控生物科技股份有限公司生产。

1.2 动物：健康成年杂种犬 24 只，雌雄兼用，体重 12~16 kg，由吉林大学实验动物部提供。

1.3 仪器：RM-6000 型多道生理记录仪，日本光电公司。SC-3 型电动呼吸机，上海医疗器械厂。EOS880 型全自动血液生化分析仪，意大利。SSW 电热恒温水槽，上海博迅实业有限公司。输液泵，保

收稿日期：2007-03-25

作者简介：李路江(1959—)，男，副主任技师，主要从事器官移植研究工作。

* 通讯作者 陈霞 Tel: (0431) 85619799 E-mail: xinchen616@yahoo.com.cn