

桃核承气改良方对家兔血管内皮损伤后信号转导及转录活化因子3和NO的影响

张雨¹, 宫丽鸿^{2*}, 时广容², 徐琳²

(1. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110000; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 辽宁 沈阳 110000)

冠心病是危害人类生命的最主要疾病之一。目前心血管领域积极开展介入治疗(PCI),以经皮冠状动脉腔内成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)为基础的介入治疗迅速发展,成为冠心病血管重建治疗的较成熟的手段,成功抢救许多患者生命。PCI后再狭窄率已经从PTCA时代的20%~30%降至目前药物支架时代的5%~8%^[1],但是PCI后再狭窄仍是影响PCI中远期疗效的重要因素。目前常规化学药防治过程中出现对肝、肾损害及大出血等严重问题仍未解决,因此PCI术后再狭窄的中医药防治研究成了人们关注的新热点。本实验旨在研究桃核承气改良方对家兔血管内皮损伤后信号转导和转录活化因子3(STAT3)及NO的影响来预防PCI术后再狭窄。

1 材料

1.1 动物及饲料:健康新西兰大耳白兔40只,体重2~2.5 kg,雌雄不拘,由辽宁中医药大学实验动物中心提供。家兔普通饲料、家兔高脂饲料(基础饲料79%、15%蛋黄粉、猪油5%、胆固醇1%)均由辽宁中医药大学动物实验中心加工。

1.2 主要试剂和仪器:鼠抗人单克隆抗体COX-2(GT201202),购自Gene公司;封闭用正常山羊血清工作液,总RNA提取试剂异硫氰酸胍(Trizol Reagent);美国Invitrogen Life Technologies公司;反转录酶(AMV),RNA酶抑制剂,dNTP混合液,Oligo(dT)15, Taq DNA聚合酶,目的基因引物均购自日本TaKaRa公司;考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒,南京建成生物工程公司;碱性磷酸酶标记的羊抗鼠IgG,北京中山生物技术有限公司;PCR扩增仪(德国Biometra),Chemi Imager5500凝胶电泳成像分析系统(美国Alphainnotech Chemi Imager);NO免疫组化一抗购自武汉博士德生物工程有限公

司;二抗生物素标记羊抗兔IgG、辣根酶标记链霉卵白素工作液、显色剂3,3'-二氨基苯甲胺(DBA)及放射免疫所用试剂均购自北京中山生物技术有限公司。

2 方法

2.1 药物制备:桃核承气改良方(大黄30 g、芒硝15 g、甘草15 g、肉桂15 g、桃仁15 g、水蛭25 g、金银花20 g),由辽宁中医药大学附属第一医院提供。各药材用水浸泡0.5 h,先武火再文火煎1 h,倒出药汁,共煎3次,将药汁合并,滤过,浓缩至100 mL(相当于生药1.35 g/mL),4℃冰箱保存。舒降之,40 mg/片,由杭州默沙东制药有限公司提供。阿司匹林,100 mg/片,批号BTA6015,由拜耳药业集团有限公司提供。研磨后,双蒸水溶解,4℃冰箱保存。

2.2 实验分组及给药:健康新西兰大耳白兔40只,随机分为4组,分别为模型组、桃核承气改良方组、化学药组、对照组,每组10只动物。除对照组外,其余各组动物高脂饲料喂养4周后行腹主动脉内膜剥脱术造模。术后各组动物普通饲料喂养,实验组ig桃核承气改良方6.075 g/kg,化学组ig舒降之(1.8 mg/kg)和阿司匹林(4.5 mg/kg),各组均给药4周,模型组、对照组ig生理盐水4.5 mL/kg。

2.3 动物造模:除对照组外的3组动物高脂饲料喂养4周造成动脉粥样硬化模型^[2],然后行腹主动脉内膜剥脱术造模:25%乌拉坦ip 0.4 mL/100 g麻醉家兔,于右侧腹股沟部进行脱毛消毒后利多卡因少量局麻,切开皮肤,分离股动脉,两动脉夹分别夹住股动脉近心端及远心端,暴露2 cm左右,动脉剪小口,经导丝导入直径1.5~2.0 mm球囊导管(依血管直径大小而定),至肾动脉下方,盐水充盈球囊(压力为4~6 kPa),缓慢回拉导管至切口处抽空球囊内液体,使压力降至零,重复上述过程3次,达到剥落腹主动脉内皮的目的。撤出导管,结扎股动脉,

收稿日期:2008-04-24

基金项目:辽宁省教育厅高等学校科学研究项目(05L246)

作者简介:张雨(1982—),男(回族),吉林省吉林市人,硕士,研究方向为中西医结合防治冠心病及PCI术后再狭窄。

Tel: 13700047762 E-mail: Zhangyu008.hi@163.com.cn

*通讯作者 宫丽鸿 Tel: 13504052332 E-mail: Linda1975@sina.com.cn

缝合皮肤,术后 3 d 连续每天 im 青霉素 8×10^5 U/只,预防感染。

2.4 实验取材:术后 4 周耳缘静脉采血,处死家兔,切开腹壁暴露腹腔,分离腹主动脉,截取 2 cm 长腹主动脉,用生理盐水冲洗后置 10% 中性甲醛溶液中 -20°C 保存,待测。

2.5 观测指标

2.5.1 家兔血清 NO 水平测定:取血 2 mL,1 500 r/min 离心 10 min,分离血清, -30°C 冰箱冻存。采用比色法,在酶标仪 570 nm 测定样品吸光度值,以亚硝酸钠为对照,按标准曲线,可以间接测定 NO 水平。

2.5.2 损伤血管中 NO 分布测定:采用免疫组化方法测定,将固定好的标本经酒精脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋; $5\ \mu\text{m}$ 连续切片; $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 室温孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性;蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min $\times$ 2 次;抗原修复; $5\% \sim 10\%$ 正常山羊血清 (PBS 稀释) 封闭,室温孵育 10 min,倾去血清勿洗。滴加一抗工作液, 37°C 孵育 1~2 h;PBS 冲洗,5 min $\times$ 3 次;滴加适量生物素标记二抗工作液, 37°C 孵育 10~30 min;PBS 冲洗,5 min $\times$ 3 次;滴加适量的辣根酶标记的链霉卵白素工作液, 37°C 孵育 10~30 min;PBS 冲洗,5 min $\times$ 3 次;DAB 显色 3~15 min;自来水冲洗,复染,脱水,透明,封片。PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性判断标准:以细胞浆呈棕黄色为阳性。应用经 Smart View2001 生物电泳图像分析软件 (上海复日科技有限公司) 进行处理、分析,测定 NO 在内皮和平滑肌细胞中阳性表达,并进行统计学处理。

2.6 家兔血管内皮中 STAT3 的 mRNA 表达

2.6.1 总 mRNA 的提取:参照 Trizol 说明书采取一步法提取总 RNA。

2.6.2 半定量 RT-PCR:取实验兔的血管内皮组织 200 mg,参照说明测定 mRNA。引物 COX-2 和 β -actin 内参对照引物由中国医科大学提供。参照 RT-PCR 试剂盒说明书合成 cDNA,参照 RT-PCR 试剂盒说明书进行 PCR 反应。取 $5\ \mu\text{L}$ PCR 产物与 $2\ \mu\text{L}$ 上样缓冲液混合,进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (120 V,45 min),电泳结束后,凝胶成像仪成像分析。

2.7 Western blotting 印迹分析 STAT3 蛋白表达:参考试剂盒说明测定。

2.8 数据处理:图像经 Smart View2001 生物电泳图像分析软件 (上海复日科技有限公司) 进行处理、分析;采用 SPSS 10.0 软件包对 RT-PCR 和 Western blotting 结果进行方差分析和 Pearson 相关

分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;免疫组化结果用列表 χ^2 检验。

3 结果

3.1 对家兔血清 NO 水平的影响:术后 4 周桃核承气改良方组、化学药组家兔血浆 NO 水平较模型组明显升高 ($P < 0.05$),给药组间无明显差异 ($P > 0.05$),结果见表 1。

表 1 各组家兔血清 NO 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Comparison of NO level in serum of rabbits in all groups ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg $\cdot$ kg $^{-1}$)	NO/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	141.67 $\pm$ 11.60
模型	—	81.69 $\pm$ 9.14*
桃核承气改良方	6075	130.76 $\pm$ 9.60* Δ
舒降之+阿司匹林	1.8+4.5	129.71 $\pm$ 9.53* Δ

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

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

3.2 对家兔损伤血管中 NO 的影响:结果表明阳性颗粒主要表达部位在腹主动脉内膜内皮细胞胞浆,动脉中膜及内皮下的平滑肌细胞胞浆有少量表达。NO 抗原表达从免疫组化结果看,模型组 NO 抗原表达明显低于其他 3 组 ($P < 0.05$),两个给药组 NO 抗原表达比模型组显著增强 ($P < 0.05$),两给药组间抗原表达无明显差异 ($P > 0.05$)。模型组内皮不光滑、有增生、不连续;给药组内皮较连续、增生减低;对照组内皮光滑、未见增生。说明桃核承气改良方能促进 NO 抗原阳性表达。

3.3 家兔血管内皮中 STAT3 的 mRNA 表达:在各组家兔血管内皮中,均可见到 STAT3 的 mRNA 表达。其中,模型组中 STAT3 的 mRNA 表达上调;桃核承气改良方组中 STAT3 的 mRNA 表达被抑制;化学药组中 STAT3 的 mRNA 表达被抑制。结果见图 1。

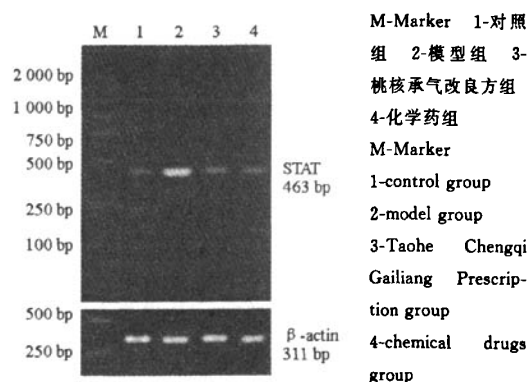
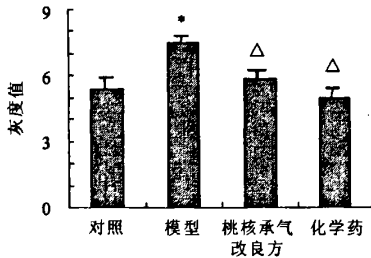


图 1 各组家兔血管内皮中 STAT3 mRNA 表达

Fig. 1 Expression of STAT3 mRNA in vascular endothelium of rabbits in all groups

3.4 Western blotting 结果:采用 FlourChem V 2.0 凝胶成像分析软件(美国)分析,记录每条蛋白电泳带的灰度值,进行半定量分析。模型组内皮中 STAT3 蛋白表达增强,与对照组比较,差异显著 ($P<0.05$);两给药组 STAT3 蛋白表达明显抑制,与模型组比较差异显著 ($P<0.05$),见图2。



与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: Δ $P<0.05$
 * $P<0.05$ vs control group; Δ $P<0.05$ vs model group

图2 各组家兔血管内皮中 STAT3 蛋白表达

Fig. 2 Expression of STAT3 protein in vascular endothelium of rabbits in all groups

4 讨论

“胸痹”病名最早见于《内经》,《内经》记载:“心痹者脉不通。脉者,血之府也……涩则心痛”。《金匮要略》所言:胸痹而痛,所以然者,责其极虚故也。PCI 术后再狭窄属于中医“血瘀证”范畴。其发病理论涉及瘀、痰、虚等多个方面,病机为脏气亏虚为本,瘀痰阻滞为标。治法理论则主要是以活血化瘀、豁痰去浊、兼以扶正等方面。因 PCI 系为外源性创伤,导致血脉受损,瘀血内停,毒邪壅于局部,与外科的创伤过程类似,并根据病变局部的感染因素和炎症反应,提出 PCI 术后再狭窄的中医发病机制不单纯是瘀痰和虚,局部特点应为瘀毒互结,兼以正气亏虚。由于新旧病因的综合作用,再次心脉闭阻的可能增加,这可能是再狭窄形成的另一主要机制。气能生血,亦能行血,故在活血化瘀、豁痰去浊的同时兼以补气之药则效果更佳。而本研究运用伤寒方桃核承气汤为基础的改良方中大黄、芒硝为软坚散结要药,防治毒邪壅于局部、防止增生,预防再狭窄共为君药;桃仁为活血祛瘀之药,水蛭为破血逐瘀之药,金银花为清热解毒之药共为臣药;肉桂补元阳、暖脾胃、除积冷、通血脉为佐药;炙甘草入心经,能补益气血以鼓动血脉,又有调和诸药之功效为使药。该方的组成特点是活血化瘀,通下瘀毒兼扶正气。

冠脉再狭窄是一种医源性疾病,通常在 PCI 术后 3~6 个月发生,单纯球囊扩张后发生率 30%~50%^[3];冠脉金属裸支架置入术后 10%~40% 的患

者可发生支架内再狭窄^[4];药物洗脱支架如雷帕霉素洗脱支架的再狭窄发生率仍有 5%~10%^[5]。研究表明,PCI 术后再狭窄的机制主要为:血栓形成、炎症反应、血管平滑肌增殖、细胞外基质及胶原纤维过量增生、血管重塑等。上述各环节互相影响,最终导致再狭窄。

目前认为血管平滑肌细胞 (VSMCs) 的增殖和迁移、血管外膜的重塑以及细胞外基质的生成是 PCI 术后再狭窄的主要机制,同时也是防治的热点和难点^[10]。研究发现,细胞内信号传导通路与 VSMCs 增殖密切相关,已得到了广泛的关注^[11]。

STAT3 是在 1994 年作为白细胞介素-6 (IL-6) 信号传递中的急性期反应因子 (acute-phase response factor, APRF) 被纯化的。STAT3 广泛表达于不同类型的细胞和组织中,参与细胞生长、恶性转化、凋亡等生理功能的调控^[6]。STAT3 与心肌细胞的发育、调节心肌收缩性及血管生成等方面有密切的关系,活化的 STAT3 可促进心肌保护因子、凋亡相关基因的表达,在心肌细胞的凋亡和存活中起重要作用。研究表明 STAT3 可调节心肌组织中血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达,促进血管生成以及心肌细胞与内皮细胞的相互作用,在心肌的代偿性肥大中起到重要作用^[7]。STAT3 不仅是血管生成的一种调节因子,还能诱导一氧化氮合酶的合成提高 NO 量,以及介导抗凋亡基因 bcl-2xl、超氧化物歧化酶 (SOD) 的生成,提高应激条件下心肌细胞的存活能力^[8,9]。NO 具有扩张血管、抑制多种血细胞对内皮的黏附和损伤、抑制血小板活化聚集及抗血管平滑肌细胞增生等作用。

本实验研究表明,桃核承气改良方能有效地降低 PCI 术后兔 STAT3 表达,提高血清 NO 量,抑制血管内皮增生,促进损伤内膜修复,从而防止损伤内皮增生,预防 PCI 术后再狭窄。本实验对桃核承气改良方防治 PCI 术后再狭窄的可行性做了初步研究,具体作用机制需要进一步探讨。

参考文献:

- [1] 刘占军,徐耕. Cilostazol 与经皮冠状动脉介入术后再狭窄的防治 [J]. 国际心血管病杂志, 2006, 33(3): 150-152.
- [2] 张勇,姜桂予,钱民章,等. 建立兔高脂血症模型及动脉粥样硬化斑块的方法 [J]. 遵义医学院学报, 2001, 24(4): 234-236.
- [3] Bauters C, Meurice T, Hamon M, et al. Mechanisms and prevention of restenosis: from experimental models to clinical practice [J]. Cardiovasc Res, 1996, 31(6): 835-846.
- [4] Rensing BJ, Vos J, Smits PC, et al. Coronary restenosis elimination with a sirolimus eluting stent: first European human experience with 6-month angiographic and

- intravascular ultrasonic follow-up [J]. *Eur Heart J*, 2001, 22(22): 2125-2130.
- [5] Mosea J W, O'Shaughnessy C, Capito R, *et al.* The US multicenter, randomized, double blind study of the sirolimus-eluting stent in coronary lesions: safety out comes at 9 months [J]. *Eur Heart J*, 2002, 23(Suppl): 264.
- [6] Hoey T, Grusby M J. STAT3 as mediators of cytokine-induced response [J]. *Adv Immunol*, 1998, 71: 145-160.
- [7] Osugi T, Oshima Y, Fujio Y, *et al.* Cardiospecific activation of signal transducer and activator of transcription 3 promotes vascular formation in the heart [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(8): 6676-6681.
- [8] Yu X, Kennedy R H, Liu S J. JAK2/STAT3, not ERK1/2 pathway mediates interleukin 6-elicited inducible NOS activation and decrease in contractility in adult ventricular myocytes [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18): 16304-16309.
- [9] Yamauchi T, Takihara K. Gp130-mediated pathway and left ventricular remodeling [J]. *J Card Fail*, 2002, 8(6 Suppl): S374-S378.
- [10] Indolfi C, Mongiardo A, Curcio A, *et al.* Molecular mechanisms of in-stent restenosis and approach to therapy with eluting stents [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2003, 13: 142-148.
- [11] Marks A R. Rapamycin: signaling in vascular smooth muscle [J]. *Transplant Proc*, 2003, 35(Suppl 13): 231S-233S.

益气通络方配合芪参益气滴丸治疗冠心病心绞痛临床观察

赵小敏

(天津第一中心医院, 天津 300192)

冠心病心绞痛的发生系冠状动脉粥样硬化所致血管狭窄、阻塞不畅引起心肌缺血缺氧的临床综合征。笔者自拟中药益气通络方配合芪参益气滴丸治疗冠心病心绞痛, 并与西药对照组进行比较, 观察临床症状, 心电图的改善, 现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料: 110例患者均为2004年9月至2007年9月本院门诊及住院患者, 随机分为治疗组和对照组。治疗组55例, 男34例, 女21例, 年龄48~79岁, 平均57.3岁, 病程0.5~16年, 平均6.9年, 初发劳力性心绞痛3例, 稳定劳力性心绞痛52例; 合并高脂血症31例, 高血压10例, 陈旧性心肌梗死4例。对照组55例, 男35例, 女20例, 年龄47~80岁, 平均57.7岁, 病程0.5~18年, 平均6.7年, 初发劳力性心绞痛5例, 稳定劳力性心绞痛50例, 合并高脂血症28例, 高血压12例, 陈旧性心肌梗死3例。

1.2 诊断及纳入标准: 参照《冠心病心绞痛疗效评定标准》^[1]的诊断标准。在病例的诊断选择上, 包括典型与不典型心绞痛, 心电图检查符合心肌缺血的冠心病诊断标准。两组病例属于稳定劳力性心绞痛、初发劳力性心绞痛。纳入病例不包括心肌梗死发作期, 中度以上高血压、重度心肺功能不全, 频发与持续性房颤、房扑、频发性室性早搏, 室上性心动过速。两组患者心功能分级采用纽约心脏分级(NYHA)均为Ⅰ、Ⅱ级, 两组患者性别、年龄、病程和心功能等

经统计处理, 差异均无显著性意义($P>0.05$), 具有可比性。

中医证候诊断标准: 气虚血瘀证^[2], 主证: 胸痹心痛, 胸闷, 心悸、气短等。次证: 面色㿖白, 气短乏力, 自汗出。舌暗有瘀斑或瘀点, 脉沉细。

2 方法

2.1 治疗方法: 治疗组采用自拟益气通络方[组成: 党参20g、丹参30g、檀香10g、血竭1g(冲)、川芎6g、瓜蒌20g、当归12g]为基本方, 阴虚者加天花粉15g、沙参15g、麦冬10g; 痰浊内阻加石菖蒲10g、半夏6g、薤白10g、胆星6g; 高血压者加石决明20g、夏枯草10g、天麻6g; 血脂高者加生山楂15g、何首乌30g。每日1剂(水煎服), 分早、晚2次温服, 每次200mL, 同时服用芪参益气滴丸(天津天士力制药股份有限公司生产, 批号Z20030139), 每次1袋, 每日3次。对照组服用消心痛(天津太平洋制药有限公司生产, 批号040905)10mg, 每日3次。两组均以6周为1疗程。

2.2 观察方法: 治疗期间每日记录血压、心率, 心绞痛次数、持续时间、部位、疼痛程度、疼痛性质、伴发症状, 心电图。

2.3 疗效判定: 依据文献方法^[1]对治疗结果做出评定。

2.3.1 症状疗效评定标准: 显效, 胸痛、胸闷、心悸、气短等症状消失或基本消失, 劳力性心绞痛原为Ⅰ、Ⅱ级者心绞痛基本消失(即在较重的超过日常生活

桃核承气改良方对家兔血管内皮损伤后信号转导及转录活化因子3和NO的影响

作者：[张雨](#)，[宫丽鸿](#)，[时广容](#)，[徐琳](#)
作者单位：[张雨\(辽宁中医药大学, 辽宁, 沈阳, 110000t\)](#)，[宫丽鸿, 时广容, 徐琳\(辽宁中医药大学附属医院, 辽宁, 沈阳, 110000\)](#)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年，卷(期)：2008, 39(9)

参考文献(11条)

1. [刘占军;徐耕](#) [Cilostazol与经皮冠状动脉介入术后再狭窄的防治](#)[期刊论文]-[国际心血管病杂志](#) 2006(03)
2. [张勇;娄桂予;钱民章](#) [建立兔高脂血症模型及动脉粥样硬化斑块的方法](#)[期刊论文]-[遵义医学院学报](#) 2001(04)
3. [Bauters C;Meurice T;Hamon M](#) [Mechanisms and prevention of restenosis:from experimental models to clinical practice](#) 1996(06)
4. [Rensing B J;Vos J;Smits P C](#) [Coronary restenosis elimination with a sirolimus eluting stent:first EurcIpean human experience with 6-month angiographic and intravascular ultrasonic follow-up](#)[外文期刊] 2001(22)
5. [Mosea J W;O'Shaughnessy C;Capito R](#) [The US multicenter,randomized,double blind study of the sirolimuseluting stent in coronary lesions:safety out comes at 9 months](#) 2002(zk)
6. [Hoey T;Grusby M J](#) [STAT3 as mediators of cytokineinduced response](#)[外文期刊] 1998
7. [Osugi T;Oshima Y;Fujio Y](#) [Cardiacspecific activation of signal transducer and activator of transcription 3 promotes vascular formation in the heart](#)[外文期刊] 2002(08)
8. [Yu X;Kennedy R H;Liu S J](#) [JAK2/STAT3,not ERK1/2pathway mediates interleukin 6-elicited inducible NOS activation and decrease in contractility in adult ventricular myocytes](#)[外文期刊] 2003(18)
9. [Yamauchi T;Takahara K](#) [Gp130-mediated pathway and left ventricular remodeling](#)[外文期刊] 2002(zk)
10. [Indolfi C;Mongiardo A;Curcio A](#) [Molecular mechanisms of in-stent restenosis and approach to therapywith eluting stents](#)[Trends][外文期刊] 2003
11. [Marks A R](#) [Rapamycin:signaling in vascular smooth muscle](#)[外文期刊] 2003(z13)

本文读者也读过(4条)

1. [王静](#), [乔万海](#), [WANG Jing](#), [QIAO Wan-hai](#) [多器官功能障碍综合征患者血管内皮损伤与炎性相关因子的研究](#)[期刊论文]-[中国危重病急救医学](#)2006, 18(2)
2. [姜恩平](#), [苏学今](#), [李红](#), [杨世杰](#) [葵藜皂苷对H2O2诱导PC12细胞凋亡保护作用及其机制研究](#)[期刊论文]-[中草药](#) 2008, 39(9)
3. [张振贤](#), [江艳芬](#), [符德玉](#), [吴丽丽](#), [周婷](#) [益气养阴、活血解毒法对冠心病患者血管内皮损伤、血小板活化及炎症因子的影响](#)[期刊论文]-[中医杂志](#)2008, 49(4)
4. [骆晓芳](#), [朱付凡](#), [LUO Xiao-fang](#), [ZHU Fu-fan](#) [血管内皮损伤与抗磷脂综合征](#)[期刊论文]-[中国优生与遗传杂志](#) 2008, 16(3)